# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ ANA MARTA SCHAFASCHEK EXPOSIÇÃO DE Chironomus sancticaroli STRIXINO & STRIXINO, 1981(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) AO SUBSTRATO DO RIO DOCE, MG/ES **CURITIBA** 2023

#### ANA MARTA SCHAFASCHEK

# EXPOSIÇÃO DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) AO SUBSTRATO DO RIO DOCE, MG/ES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Yoshie Yamamoto

CURITIBA 2023

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

#### Schasfaschek, Ana Marta

Exposição de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) ao substrato do Rio Doce, MG/ES / Ana Marta Schasfaschek. – Curitiba, 2023. 1 recurso on-line: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia.
Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva.
Coorientadora: Profª. Drª. Flávia Yoshie Yamamoto

1. Biomarcadores. 2. Histopatologia. 3. Sedimentos. I. Silva, Mario Antônio Navarro da, 1963-. II. Yamamoto, Flávia Yoshie. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -40001016008P4

#### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA MARTA SCHAFASCHEK** intitulada: "EXPOSIÇÃO DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) AO SUBSTRATO DO RIO DOCE, MG/ES", sob orientação do Prof. Dr. MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica 28/07/2023 11:27:34.0 MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 01/08/2023 12:01:14.0 DEBORA REBECHI Avaliador Externo (FORREST INNOVATIONS)

Assinatura Eletrônica
28/07/2023 11:18:00.0
MARCO TADEU GRASSI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ/DEPARTAMENTO DE QUÍMICA)

Assinatura Eletrônica 27/07/2023 14:01:16.0 MARCELO PEDROSA GOMES Avaliador Externo (DEPARTAMENTO BOTÂNICA -UFPR)

Assinatura Eletrônica 28/07/2023 09:21:28.0 FLAVIA YOSHIE YAMAMOTO Coorientador(a) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

#### **AGRADECIMENTOS**

À minha família Célia Schafaschek, Lucas Schafaschek e Regina Schafaschek, pelo apoio incondicional e cuidado durante todos esses anos pegando a estrada em meio a uma pandemia.

Ao professor Mário Navarro pela orientação, apoio, estrutura, ensinamentos, pelas horas de discussões e pela imensa paciência neste período.

À Dra. Flávia Yamamoto pela coorientação, estrutura para a coleta de campo e por todo conhecimento passado.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, estendendo os agradecimentos aos professores do programa, aos colegasdo departamento e a secretária pelas conversas nos corredores, organizações de eventos e todo conhecimento que adquiri nestes últimos anos.

À UNESP pela parceria que possibilitou as viagens de campo e coleta dos sedimentos para os experimentos.

Aos pescadores e moradores locais ao longo do Rio Doce em Minas Gerais e Espiríto Santo e aos colegas de coleta de campo.

Aos colegas de laboratório Mariana, Emily, Gisele, Vinicius, Íttalo, Cinara, Bryan, Angela, Patrícia, Ana Carolina por todo apoio nos experimentos, análises e pelo convívio diário que propiciaram que as coisas se tornassem mais leves nestes anos.

Ao meu comitê de acompanhamento: Professores Luis Fernando Fávaro, Carolina Freire, Márcio Pie e Marco Grassi, por tudo que aprendi com vocês.

Ao Departamento de Química pela parceria nas análises químicas em especialao professor Marco Grassi e a Mayara Padovan.

Aos departamentos de Biologia Molecular e Botânica em especial aos professores Luis Fernando Faváro, Marcelo Pedrosa Gomes e a professora Lucélia Nonatti por proporcionarem condições para que eu conseguisse fazer meus cortes histológicos.

Aos meus amigos pela paciência na ausência, pelo apoio incondicional e cuidado comigo, em especial Diego, Marcos, Jackson, Laís, Marina, Leonardo. E meus primos Hebert, Verônica, Lia, Sandro, Milena, Arthur e Valentina.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa.



#### **RESUMO**

Atividades antrópicas como agricultura, indústrias e efluentes urbanos, assim como rejeitos de mineração, quando nos corpos d'água, podem se depositar nos sedimentos. Neste ambiente podem influenciar negativamente os organismos bentônicos como os Chironomidae (Diptera), importante elo da teia alimentar dos ecossistemas dulcícolas. Diante da necessidade de compreender as possíveis consequências de sedimentos com misturas complexas de contaminantes, esta pesquisa teve porobjetivo avaliar efeitos letais e subletais em Chironomus sancticaroli expostos aos sedimentos de diferentes segmentos da bacia do Rio Doce, MG/ES, após quatro anos do evento do rompimento da barragem de extração de minério de ferro (Fundão). Foram realizadas coletas de sedimentos em julho e agosto de 2019 em seis locais ao longo da bacia do Rio Doce: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Nague (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV) e Aimorés (AIM). Imaturos de Chironomus sancticaroli foram expostos por um período de oito dias e após a exposição foram contabilizadas a sobrevivência das larvas e foram preparadas amostras para determinação de estágio de desenvolvimento, bioconcentração de metais, verificação de respostas na atividade de enzimas de biotransformação, estresse oxidativo, danos em biomoléculas, neurotoxicidade, expressão gênica de hemoglobinas e metalotioneína e danos histopatológicos. Conforme observado pelas análises multivariadas, a composição química de todos os sedimentos é influenciada por metais, principalmente no alto Rio Doce, já o médio Rio Doce parece ser influenciado também por contaminantes orgânicos como HPAs e piretroides. As larvasa presentaram metais bioconcentrados em exposição a todos os pontos de coleta, e foi observado que grande parte do sedimento estava concentrado no sistema digestório e túbulos de Malpighi da larva. A exposição a todos os sedimentos provocou alterações no tempo de desenvolvimento, observado pela presença precoce de pupas. Além disso a sobrevivência reduziu significativamente nos pontos do alto e médio Rio Doce. No médio Rio Doce foi constatado também os maiores scores de alterações subletais em diferentes biomarcadores, principalmente naqueles relacionados a biotransformação de compostos orgânicos, e maior frequência das alterações histológicas do sistema digestório e do corpo gorduroso. Os sedimentos da bacia causaram efeitos diversos a níveis subletais e letais observados em C. sancticaroli. Nos diferentes segmentos avaliados, foram observados diversidade de composição, que refletem o impacto antrópico nos diferentes segmentos, incluindo grande carga de metais, superiores aos valores máximos permitidos na legislação ambiental. A presença e biodisponibilidade de metais nos sedimentos ao longo de toda a bacia é reflexo da presença natural na composição geológica, da intensa atividade de extração de minérios ao longo dos últimos séculos bem como a ressuspenssão de contaminantes através de eventos extremos, como o rompimento da barragem do Fundão. Os contaminantes orgânicos também parecem influenciar a composição do sedimento, relacionados com a falta de tratamento adequada do esgoto dos centros urbanos, principalmente naqueles mais populosos como Governador Valadares. Essa complexa mistura, bem como fatores geomorfológicos como granulometria e a presença de materia orgânica parecem propiciar a toxicidade desses sedimentos em larvas de C. sancticaroli.

Palavras-chaves: Biomarcadores; Histopatologia; Sedimento

#### **ABSTRACT**

Anthropogenic activities such as agriculture, industries and urban effluents, as well as mining waste, when in water bodies, can be deposited in sediments. In this environment, they can negatively influence benthic organisms such as Chironomidae (Diptera), an important link in the food web of freshwater ecosystems. Faced with the need to understand the possible consequences of sediments with complex mixtures of contaminants, this research aimed to evaluate lethal and sublethal effects on Chironomus sancticaroli exposed to sediments from different segments of the Doce River basin. MG/ES, four years after the rupture event of the iron ore extraction dam (Fundão). Sediment collections were carried out in July and August 2019 at six locations along the Doce River basin: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Reference (REF), Governador Valadares (GOV) and Aimorés (AIM). Immatures of C. sancticaroli were exposed for a period of eight days and after exposure the survival of the larvae were counted and samples were prepared to determine the stage of development, bioconcentration of metals, verification of responses in the activity of biotransformation enzymes, oxidative stress, damage to biomolecules, neurotoxicity, gene expression of hemoglobins and metallothionein and histopathological damage. As observed by the multivariate analyses, the chemical composition of all sediments is influenced by metals, mainly in the upper Doce River, while the middle Doce River seems to be also influenced by organic contaminants such as PAHs and pyrethroids. The larvae showed bioconcentrated metals on exposure to all collection points, and it was observed that a large part of the sediment was concentrated in the digestive system and Malpighian tubules of the larva. Exposure to all sediments caused changes in development time, observed by the early presence of pupae. In addition, survival has significantly reduced at points in the upper and middle Doce River. In the middle Doce River, the highest scores of sublethal changes in different biomarkers were also found, especially those related to the biotransformation of organic compounds, and a higher frequency of histological changes in the digestive system and in the fat body. The basin sediments caused diverse effects at sublethal and lethal levels observed in C. sancticaroli. In the different evaluated segments, diversity of composition was observed, which reflects the anthropic impact on the different segments, including a large load of metals in the composition, higher than the maximum values allowed in the environmental legislation. The presence and bioavailability of metals in the sediments throughout the basin is a reflection of the natural presence in the geological composition, the intense activity of mineral extraction over the last centuries, as well as the resuspension of contaminants through extreme events, such as the rupture of the Fundão dam. Organic contaminants also seem to influence the composition of the sediment, related to the lack of proper sewage treatment in urban centers, especially in the most populous ones like Governador Valadares. This complex mixture, as well as geomorphological factors such as granulometry and the presence of organic matter, seem to lead to the toxicity of these sediments to C. sancticaroli larvae.

Keywords: Biomarkers; Histopathology; Sediment.

# LISTA DE FIGURAS

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i>
2. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS
FIGURA 2. Mapa com a localização dos seis pontos de coleta ao longo da bacia do
Rio Doce.Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: Gualaxo do Norte (GUA),
UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares
(GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: Aimorés (AIM) No Mapa está
indicado o local de ruptura da barragem fundão em 2015 e os limites do território dos
estados
FIGURA 3. Larva de Chironomus sancticaroli em ínstar47

# CAPÍTULO I

FIGURA 1. Curvas analiticas dos elementos analisados no ICP-OES71
FIGURA 2. Imagem em vista ventral da cápsula cefálica com indicação dos marcos
para obtenção das seguintes medidas: comprimento da região da base da cápsula até
a ponta do dente trífido (linha vermelha) para medição do desenvolvimento das
larvas72
FIGURA 3. Concentração por grama de larvas dos elementos químicos inorgânicos
dentro dos organismos em relação ao controle
FIGURA 4. PCA dos dados da bioconcentração dos contaminantes inorgânicos
detectados nas larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce, por ponto de
coleta. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 2 = Gualaxo do Norte (GUA), 3
= UHECandonga (CAN), 4 = Naque (NAQ), 6 = Referência (REF), 7 = Governador
Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 8 = Aimorés (AIM). 1
e 5 = Controles (C)
FIGURA 5. PCA dos dados da bioconcentração dos contaminantes inorgânicos
detectados nas larvas expostas aos sedimentos do Rio Doce, com amostras
agrupadas por região da bacia hidrográfica do Rio Doce. Alto = Gualaxo do Norte e
UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares78
FIGURA 6. PCA dos metais e metaloides detectados nos sedimentos da bacia do Rio
Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado
de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque
(NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no
Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM)79
FIGURA 7. PCA dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos detectados nos
sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos.
Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE
Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares
(GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM)80
FIGURA 8. PCA dos piretroides detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce em
relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado de Minas
Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4
= Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do

Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM)80
FIGURA 9. PCA de todos os elementos químicos (hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos, piretroides, metais e metaloides) e matéria orgânica detectados nos
sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos.
Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE
Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares
(GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM)81
FIGURA 10. Correlação de Spearman (rs) bioconcentração de metais nas larvas,
representados entre conchetes [ ], e a concentração de metais no sedimento
nomenclaturas sem colchetes81
FIGURA 11. Sobrevivência de Chironomus sancticaroli após exposição subcrônica a
seis sedimentos coletados ao longo da Bacia do Rio Doce no período de 10/07/2019
a 20/08/2019. Controles (C). Pontos do alto Rio Doce: Gualaxo do Norte (GUA), UHE
Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: Naque (NAQ), Referência (REF),
Governador Valadares (GOV). Ponto do baixo Rio Doce: Aimorés (AIM). * = pontos
apresentaram diferença significativa no teste a posteriori de Tukey (p≤0,05)82
FIGURA 12. Sobrevivência de Chironomus sancticaroli após exposição subcrônica a
seis sedimentos coletados no alto, médio e baixo Rio Doce. Controles (C). Pontos do
alto Rio Doce: Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Pontos do médio Rio Doce: Naque,
Referência, Governador Valadares. Ponto do baixo Rio Doce: Aimorés. * = pontos
apresentaram diferença significativa no teste a posteriori de Tukey (p≤0,05)83
FIGURA 13. Porcentagem de estágio de desenvolvimento (larvas, pupas e adultos)
ao final da exposição (oito dias) de Chironomus sancticaroli ao sedimento de
diferentes pontos ao longo da Bacia do Rio Doce. Controle (C). Gualaxo do Norte
(GUA). UHE Candonga (CAN). Naque (NAQ). Referência (REF). Governador
Valadares (GOV). Aimorés (AIM)84
FIGURA 14. Porcentagem de estágio de desenvolvimento (larvas, pupas e adultos)
ao final da exposição (oito dias) de Chironomus sancticaroli ao sedimento do alto,
médio e baixo Rio Doce. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Gualaxo do Norte e
UHE Candonga. Pontos do médio Rio Doce: Naque, Referência, Governador
Valadares. Ponto do baixo Rio Doce: Aimorés84
FIGURA 15. Média, valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica
(mm) de larvas de quarto instar de Chironomus sancticaroli após exposição

subcrônica (oito dias), em substratos de seis localidades ao longo do Rio Doce. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV). Ponto do baixo Rio Doce: Aimorés (AIM). Letras diferentes indicam diferença significativa para o teste a posteriori de Dunn's ((p≤0,05).....85 FIGURA 16. PCA de todos os elementos químicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, piretroides, metais e metaloides) e matéria orgânica detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce e os parâmetros biológicos (sobrevivência, larvas, pupas e adultos) em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos do alto Rio Doce: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto do baixo Rio Doce: 6 = Aimorés (AIM)......86 FIGURA 17. PCA de metais bioconcentrados nas larvas e os parâmetros biológicos (sobrevivência, larvas, pupas e adultos) em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos do alto Rio Doce: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto do baixo Rio Doce: 6 = Aimorés (AIM).......87

# **CAPÍTULO II**

FIGURA 1. Gel de agarose com amostras de RNA dos pontos GOV e AIM para
averiguação da integridade após tratamento com DNAse. Pb = número de pares de
bases do fragmento
FIGURA 2. Respostas bioquímicas de larvas de Chironomus sancticaroli expostas por
oito dias a diferentes sedimentos da Bacia do Rio Doce (Minas Gerais e Espírito
Santo). Atividade enzimática de $\alpha$ -esterase (EST- $\alpha$ nmol $\alpha$ -naftol/mg ptn/min), $\beta$ -
esterase (EST- $\beta$ nmol $\beta$ -naftol/mg ptn/min), Glutationa S-Transferase (GST
μmoles/mg ptn/min), Superóxido dismutase (SOD (U) SOD mg/ptn), Catalase (CAT
μmol/mg de proteína <sup>-1</sup> ) e acetilcolinesterase (AChE μmoles/mg ptn/min). Peroxidação
lipídica (LPO nmol hidroperóxidos mg/ptn), Danos em DNA. Sedimentos de exposição:
Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF),
Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM)124
FIGURA 3. Respostas genéticas de larvas de Chironomus sancticaroli expostas por
oito dias a diferentes sedimentos da Bacia do Rio Doce (Minas Gerais e Espírito
Santo). Expressão gênica das isoformas de hemoglobinas C (HbC) e E (HbE) e da
metalotioneina (MT). Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE
Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV),
Aimorés (AIM)125
FIGURA 4. Indíce Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) para cadaponto
de coleta do sedimento em que as larvas de Chironomus sancticaroli foram expostas
ao longo de oito dias. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase.
EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT =
catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE =
Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte
(GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador
Valadares (GOV), Aimorés (AIM). O valor de S representa o resultado da soma dos
valores atribuídos a cada um dos biomarcadores em relação ao controle. Os
resultados são apresentados como gráficos de radar indicam o desvio de todos os
biomarcadores em relação ao controle. Os valotes acima da linha zero representam a
indução dos biomarcadores, enquanto os valores abaixo de zero representam inibição
dos biomarcadores. Quanto maior o valor de S. maior acúmulo de alteração dos

biomarcadores em exposição ao sedimento do ponto de coleta indicado127
FIGURA 5. A-B: Região da válvula estomodeal da larva de Chironomus sancticaroli.
C-F: Região II do intestino médio da larva de Chironomus sancticaroli. A: corte
longitudinal dos cecos gástricos da larva evidenciando a válvula estomodeal e o lúmen
da região I do intestino médio de larva controle. B: corte longitudinal de larva exposta
ao sedimento do pnto REF da bacia do Rio Doce evidenciando resíduos de sedimento
agrupados na região basal da célula do ceco gástrico (seta). C: Corte longitudinal da
região II do intestino médio de larva controle. D-F: Corte longitudinal da região II do
intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto REF (D) e CAN (E-F)
evidenciando grânulos agrupados na região basal das células (setas). ce: cecos
gástricos; lu: lúmen do intestino; ve: válvula estomodeal
FIGURA 6. A-B,E: Região I no intestino médio de larva de Chironomus sancticarolis
C-D: Região II do intestino médio de larva de Chironomus sancticaroli. A: corte
longitudinal da região I do intestino médio de controle. B e E: corte transversal da
região I do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto REF da bacia do
rio Doce evidenciando resíduos de sedimento no citoplasma das células (setas). C
Corte longitudinal da região II do intestino médio de larva controle. D: Corte
longitudinal da região II do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto
NAQ evidenciando resíduos de sedimento no citoplasma das células (cetas). lu: lúmer
do intestino
FIGURA 7. Região III do intestino médio de larva de Chironomus sancticaroli. A: Corte
longitudinal da região III do intestino médio de larva controle. B: Corte longitudinal da
região III do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto GOV
evidenciando alteração na morfologia das células (setas). lu: lúmen do intestino
131

FIGURA 8. Corpo gorduroso da larva de *Chironomus sancticaroli* em corte lingitudinal. A: Corpo gorduroso de larva controle evidenviando os trofócitos. B: Corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto CAN da bacia do rio Doce evidenciando vacuolização no citoplasma dos trofócitos (setas pretas). C: Corpo gorduroso de larva controle evidenciando os enócitos pequenos que se encontram em grandes grupos (cabeça da seta em branco). D: Corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto NAQ evidenciando vacuolização no citoplasma dos enócitos pequenos (setas pretas). E: Corpo gorduroso de larva controle evidenciando os enócitos maiores que

se agrupam com três ou quatro células. F: Corpo gorduroso de larva exposta ao
sedimento do ponto CAN evidenciando vacuolização no citoplasma dos enócitos
maiores (setas pretas). cgp: corpo gorduroso parietal; cgv: corpo gorduroso visceral;
en: enócito132
FIGURA 9. Corpo gorduroso da larva de Chironomus sancticaroli. A,C: Corte
longitudinal do corpo gorduroso de larva controle evidenciando os trofócitos. B: Corte
longitudinal do corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto NAQ da Bacia
do rio Doce evidenciando aumento do tamanho dos trofócitos parietais (setas). D:
Corte longitudinal do corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto REF
evidenciando alterações nucleares nos trofócitos (setas). cgp: corpo gorduroso
parietal; ct: cutícula; me: músculo133
FIGURA 10. Túbulos de Malpighi da larva de Chironomus sancticaroli. A: Corte
longitudinal do túbulo de larva controle. B-D: Corte lonitudinal do túbulo de larvas
expostas ao sedimento do ponto NAQ da Bacia do Rio Doce evidenciando resíduos
de sedimento no citoplasma das células (setas). cgp: corpo gorduroso parietal; me:
músculo134
FIGURA 11. Análises de Componentes Principais (PCA) dos contaminantes analisados
no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os biomarcadores bioquímicos e
genéticos. Grupos químicos analisados no sedimento: Hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos, metais pesados/metaloides e piretroides. AChE = acetilcolinesterase.
GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD =
Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA.
HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de
exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ),
Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente
principal 1. Dim 2 = componente principal 2135
FIGURA 12. Análises de Componentes Principais (PCA) dos contaminantes analisados
no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os biomarcadores bioquímicos e
genéticos. Grupos químicos analisados no sedimento: Hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos, metais pesados/metaloides e piretroides. AChE = acetilcolinesterase.
GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD =
Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA.
HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da bacia

do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE
Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés.
Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2136
FIGURA 13. Análises de Componentes Principais (PCA) dos hidrocarbonetos
policíclicos aromáticos analisados no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os
biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST =
Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD =
Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA.
HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de
exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ),
Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente
principal 1. Dim 2 = componente principal 2137
FIGURA 14. Análises de Componentes Principais (PCA) dos hidrocarbonetos
policíclicos aromáticos analisados no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os
biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST =
Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD =
Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA.
HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da bacia
do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE
Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés.
Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2137
FIGURA 15. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais pesados e
metaloides analisados no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os biomarcadores
bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-
Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido
dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC =
Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de
exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ),
Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente
principal 1. Dim 2 = componente principal 2138
FIGURA 16. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais pesados e
metaloides analisados no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os biomarcadores
bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-

Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido
dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC =
Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da bacia do Rio
Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga.
Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 =
componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2139
FIGURA 17. Análises de Componentes Principais (PCA) dos piretroides analisados no
sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os biomarcadores bioquímicos e genéticos.
AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase.
EST beta = $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO =
Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E.
MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE
Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV),
Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal
2140
FIGURA 18. Análises de Componentes Principais (PCA) dos piretroides analisados
no sedimento por Yamamoto et al., 2023a e os biomarcadores bioquímicos e
genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -
esterase. EST beta = $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = catalase.LPO
= Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina
E. MT = Metalotioneína. Região da Bacia do Rio Doce em que o sedimento foi
coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e
Governador Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal1. Dim 2 =
componente principal 2140
FIGURA 19. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais concentrados nas
larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostas aos sedimentos da Bacia do Rio Doce ao
longo de oito dias e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE =
acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta
= $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação
lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT =
Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga
(CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés
(AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2141

FIGURA 20. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais concentrados nas
larvas de Chironomus sancticaroli expostas aos sedimentos da Bacia do Rio Doce ao
longo de oito dias e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE =
acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa = $\alpha$ -esterase. EST beta
= β-esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = catalase. LPO = Peroxidação
lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT =
Metalotioneína. Região da bacia do rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto =
Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador
Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente
principal 2142
FIGURA 21. Análise de correlação entre os biomarcadores e os metais
bioconcentrados nas larvas143
FIGURA 22. Análise de Componentes Principais (PCA) entre a granulometria e
contaminantes químicos (metais, metaloides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
e piretroides) dos sedimentos da bacia do Rio Doce (Yamamoto et al., 2023b) que
foram utilizados nos bioensaio de exposição subcrônica em larvas de <i>Chironomus</i>
sancticaroli e a frequência de alterações histológicas analisadas. LodoArgila = lodo e
argila <63 μm; AreiaMuitoFina = areia muito fina 63-125 μm; AreiaFina = areia fina
125-250 μm; AreiaMedia = areia média 250-500 μm; Areiagrossa = areia grossa 0.5
- 1 mm; AreiaMuitoGrossa = areia muito grossa >1 mm; MatOrg = matéria orgânica.
CGC = grânulos no ceco gástrico; GRII = grânulos na região II do mesêntero; SRI =
sedimento na região I do mesêntero; SRII = sedimento na região II do mesêntero;
ARIII = alteração na região III do mesêntero; VCT = vacúolo citoplasmático no trofócito;
VCE = vacúolo citoplasmático no enócito; ANT = alteração no núcleo do trofócito; GTM
= grânulos no Túbulo de Malpighi. Região da bacia do Rio Doce em que o sedimento
foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN); Médio = Naque
(NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV); Baixo = Aimorés (AIM). Dim
1 = componente principal 1. Dim 2 = Componente principal 2144

# LISTA DE TABELAS

# **MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS**

<b>TABELA I</b> . Localização e características dos pontos de coleta de sedimentos ao longo
do Rio Doce de acordo com as três regiões: Alto, médio e baixo, acompanhado
do nome do munícipio da área de influência, coordenadas geográficas e as
principais atividades antrópicas para cada região da Bacia nas proximidades do
ponto de coleta44
TABELA II. Dados dos parâmetros físico-químicos da água, no momento inicial e final
dos bioensaios, onde foram utilizados sedimentos dos seis pontos de coleta ao
longo do Rio Doce. Controle (C). Pontos localizados no Estado de Minas Gerais:
Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Rio referência
(REF), Governador Valadares (GOV). Ponto localizado do Estado do Espírito
Santo: Aimorés (AIM)48

# CAPÍTULO I

<b>TABELA I</b> . Valores dos parâmetros instrumentais ICP-OES para obtenção das curvas
analíticas e quantificação da bioconcentração dos elementos inorgânicos nas
larvas de Chironomus sancticaroli após exposição ao sedimento da bacia doRio
Doce68
TABELA II. Fator de bioconcentração (FBC) de metais pesados em larvas de
Chironomus sancticaroli76
TABELA III. Valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm)
de larvas de quarto instar de C. sancticaroli após exposição subcrônica (oito dias),
aos sedimentos de seis localidades ao longo do Rio Doce. Controle (C). Pontos
localizados no Estado de Minas Gerais: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga
(CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV). Ponto
localizado no estado do Espírito Santo: Aimorés (AIM)85

# **CAPÍTULO II**

TABELA I. Sequências dos primers utilizados para expressão gênica da HbC, HbE
MT e β-actina em <i>Chironomus sancticaroli</i> 12
TABELA II. Alterações histológicas observadas em larvas de Chironomus sancticaro
expostas por oito dias ao sedimento de seis pontos ao longo da bacia do Rio Doce
Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: Gualaxo do Norte (GUA), UHE
Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadare
(GOV). Ponto localizado no estado do Espírito Santo: Aimorés (AIM). = Controle
Ao todo foram observadas dez larvas de cada ponto

#### LISTA DE SIGLAS

**ABC** ATP-binding cassette

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

**Ace** Acenafteno

**AChE** Acetilcolinesterase

Aci Acenaftileno AlM Aimorés

**AKH** Hormônio antidiurético

ANA Agência Nacional de àguas e Saneamento Básico

ANOVA Análise de Variância

Ant Antraceno

**ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATPase Adenosinatrifosfatases
BaA Benzo(a)antraceno
BaP Benzo(a)pireno
BbF Benzo(b)fluoranteno
BeP Benzo(e)pireno
BghiP Benzo(g,h,i)perileno
2,6-di terc-butil-p-cresol

**BIF** Bifentrina

BkF Benzo(k)fluoranteno
BSA Albumina de soro bovino

CAN Candonga CAT Catalase

**CBH** Comitê de Bacia Hidrográfica

**cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementar

**CETESB** Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

**CONAMA** Conselho Nacional de Meio Ambiente

Cri Criseno
CYF Ciflutrina
CYP Cipermetrina

**DahA** Dibenzo(a,h)antraceno

**DBO** Demanda bioquímica de oxigênio

DBT Dibenzotiofeno
DEL Deltametrina

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**dNTP** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados **DTNB** 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico

**DZUP** Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure

**EDTA** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EPA** Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos **IBR** Índice Integrado de resposta de biomarcadores

Ecd Ecdisona
ES Espírito Santo
EST-α Esterase alfa

**EST-**β Esterase beta

FBC Fator de Bioconcentração

Fen Fenantreno
Fl Fluoreno
Fltr Fluoranteno

GOV Governador Valadares
GST Glutationa-S-Transferase

**GUA** Gualaxo do Norte

**HSP70** Proteína de choque térmico de 70 kD

Indeno(1,2,3-c,d)pireno

ICP OES Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado

Individualmente

**HB** Hemoglobina

**HPA** Hidrocarnonetos policíclicos aromáticos

JH Hormônio juvenil

LAMFIC<sup>2</sup> Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e

Chironomidae

LDH Desidrogenase láctica LOQ Limite de quantificação

LPO Lipoperoxidação

MDH Malato-desidrogenase

MG Minas Gerais

1MNaf 1-metilnaftaleno

2Mnaf 2-metilnaftaleno

MT Metalotioneína

MXR Resistência a múltiplas drogas

Naf Naftaleno NAQ Naque

NEPEA Núcleo de Estudos em poluição e Ecotoxicologia Aquática

NRC National Research Council

OFCD Organisation for Economic Co-operation and Development OFFICE OFFIC

P450 Citocromo P450

PCA Análise de Componentes Principais PCR Reação em Cadeia Polimerase

PER Permetrina
Per Perileno

PH Potencial hidrogeniônicoPIB Produto interno bruto

Pir Pireno

PTTH Hormônio protoracicotrópico

**REF** Referência

**RNA** Ácido ribonucleico

**ROS** Espécies reativas de oxigênio

SOD Superóxido dismutase
UHE Usina Hidrelétrica

**UNESP** Universidade Estadual de São Paulo

**USA** United States of America

#### **LISTA DE SÍMBOLOS**

Al Alumínio
Ag Prata
Ba Bário
Ca Cálcio

CaSO<sub>4</sub> Sulfato de cálcio

Cd Cádmio Centímetro Cm Co Cobalto Cr Cromo Cu Cobre Fe Ferro G Grama HNO<sub>3</sub> Ácido nítrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio

**K** Potássio

KCI Cloreto de potássiokm² Quilômetros quadrados

kW Quilowatt
Li Lítio
L Litro

Mg Magnésio

mgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O Sulfato de magnésio (7H<sub>2</sub>O)

Min Minuto
MHz Megahertz
mL Mililitro
Mn Manganês
Na Sódio

NaCl Cloreto de sódio NaHCO<sub>3</sub> Bicarbonato de sódio

Ni Níguel Ρ Fósforo P.A Para análise Pb Chumbo S Enxofre Se Selênio Mg Micrograma μS Microsiemens Unidade (U) Zn Zinco

# SUMÁRIO

Apres	sentação	31
1.	INTRODUÇÃO GERAL	32
1.1.	OBJETIVO GERAL	41
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.	MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	42
2.1 Ca	aracterização da Bacia do Rio Doce	42
2.2. Aı	mostras do sedimento do Rio Doce	43
2.3. Aı	nálises químicas	45
2.3.1	Colônia de Chironomus sancticaroli Strixino e Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)	45
2.4. Te	este de sensibilidade da colônia matriz <i>Chironomus sancticaroli</i>	
2.5. Bi	ioensaios de toxicidade	46
2.5.1.	Condições dos bioensaios	46
2.5.2.	Exposição subcrônica	47
REFE	RÊNCIAS	49
	TULO I MULTIPLAS FONTES DE POLUENTES QUE ALCANÇAM A BA	
	IO DOCE E SEU IMPACTO NA BIOLOGIA DE DIPTERA (CHIRONOMID TÔNICO	-
	JMO	
	TRACT	
1	INTRODUÇÃO	
1.1.	OBJETIVOS	66
1.1.1	Objetivo geral	66
1.1.2	Objetivo específicos	66
2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1.	Bioconcentração	67
211	Preparo de amostras para determinação multielementar por Espectrometria	a de

	Emissão Óptica por Plasma Acoplado individualmente (ICP OES)	67
2.1.2.	Análise das amostras por Espectrometria de Emissão Óptica por	
	PlasmaAcoplado individualmente (ICP OES)	68
2.2.	Parâmetros biológicos	71
2.2.1.	Sobrevivência	71
2.2.2.	Tamanho da cápsula cefálica	72
2.3.	Análise dos dados	73
3	RESULTADOS	74
3.1.	Bioconcentração	74
3.2.	Química do sedimento	78
3.2.1.	Análises multivariadas	78
3.3.	Parâmetros biológicos	82
3.3.1.	Sobrevivência e estágio de desenvolvimento	82
3.3.2.	Tamanho da cápsula cefálica	85
3.3.3.	Análises multivariadas	86
4	DISCUSSÃO	87
5	CONCLUSÃO	93
REFE	RÊNCIAS	94
CAPÍ	TULO II ALTERAÇÕES SUBLETAIS - BIOQUÍMICAS, MOLECULAR	ES E
HIST	OLÓGOCAS - EM Chironomus sancticaroli STRIXINO & STRIXINO,	1981
-	ERA: CHIRONOMIDAE) EXPOSTOS AO SEDIMENTO DA BACIA DO	
	=	
	JMO	
ABST	TRACT	106
1	INTRODUÇÃO	107
1.1.	OBJETIVOS	113
1.1.1	Objetivo geral:	113
1.1.2	Objetivo específicos:	114

2	MATERIAL E MÉTODOS114		
2.1.	Biomarcadores bioquímicos		
2.2.	Expressão gênica118		
2.2.1.	Amostras		
2.2.2.	Extração de RNA total		
2.2.3.	Tratamento com DNAse		
2.2.4.	Transcrição reversa (cDNA)		
2.2.5.	Primers119		
2.2.6.	Reação de qPCR		
2.3. h	istologia121		
2.4. A	nálise dos dados122		
3	RESULTADOS123		
3.1.	Biomarcadores bioquímicos		
3.2.	Biomarcadores genéticos		
3.3.	Índice Integrado de Biomarcadores		
3.4.	Histologia		
3.5.	Análises multivariadas135		
4	<b>DISCUSSÃO</b> 144		
5	<b>CONCLUSÃO</b> 154		
REFERÊNCIAS155			
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>			
REFERÊNCIAS GERAIS175			
MATERIAL SUPLEMENTAR207			

#### Apresentação

A tese está estruturada em "Introdução geral", "Material e Métodos gerais", "objetivos" e dois capítulos subsequentes subdivididas de acordo com a necessidade de melhor organizar seu conteúdo. Na "Introdução geral" apresentam-se o objeto em estudo (espécie Chironomus sancticaroli), a problemática envolvento a contaminação de sedimentos do Rio Doce, os pressupostos que norteiam a pesquisa e dados bibliográficos que justificam a sua importância. No "Material e Métodos gerais" é descrita as características dos locais de amostragem, a metodologia detalhada de coleta do sedimento e condições experimentais da pesquisa. Após isso, são elencados os "Objetivos" da pesquisa. Na sequência, a seção "Referências" contém a lista das fontes da literatura citadas no prólogo. Os capítulos apresentam os procedimentos metodológicos empregados para atingir os objetivos específicos de cada um dos capítulos. Os capítulos foram separados pelos diferentes níveis de respostas biológicas. O Capítulo I abordou endpoints, o Capítulo II as alterações dos biomarcadores. Além disso, cada um deles contem a sua própria lista de referências. Finalizando a tese, segue a "Conclusão Geral" com as conclusões gerais e a lista de "Referências Gerais", normativa exigida pela instituição.

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ambientes naturais são vulneráveis ao constante impacto das múltiplas atividades antrópicas, muitas das quais degradam recursos naturais essenciais para a manutenção da vida, como a água. A elevada intensidade destas atividades que utilizam os recursos hídricos para captação ou diluição de afluentes, ou aquelas que geram resíduos que são carregados aos rios e riachos, tem levado a muitos conflitos sócio-ambientais sobre o uso da água e a sua qualidade.

Neste cenário, pesquisas de qualidade ambiental em ambientes aquáticos são necessárias para compreender como as substâncias isoladas ou em mistura derivadas destes resíduos se comportam na coluna de água, sedimento e organismos, e quais são os efeitos diretos ou indiretos sobre o sistema natural e os organismos expostos.

Um exemplo importante de ambiente aquático impactado por diferentes poluentes, é a bacia hidrográfica do Rio Doce, localizada no sudeste do Brasil. A bacia possui área de drenagem de 86.715 km², dos quais 86% estão no Leste de Minas Gerais e 14% no Nordeste do Espírito Santo (CBH DOCE, 2020). O Rio Doce tem extensão de 879 quilômetros nascendo nas Serras da Mantiqueira e do Espinhaço, até desaguar no Oceano Atlântico no município de Linhares, no estado do Espiríto Santo (CBH DOCE, 2020).

De acordo com suas características morfoestruturais, a bacia do Rio Doce se divide em três regiões: Alto, médio e baixo. O alto Rio Doce compreende área das nascentes, com altitudes que atingem cerca de 2.600 metros até a confluência dos rios Doce e Piracicaba, perto da cidade de Ipatinga (MG); o médio Rio Doce está localizado a jusante da confluência do Rio Doce com o rio Piracicaba até a divisa entre Minas Gerais e Espírito Santo, com altitudes médias predominantes de 350 metros; e o baixo Rio Doce da divisa entre Minas Gerais e Espírito Santo até a foz no Oceano Atlântico (Coelho, 2007). A paisagem pela qual a bacia atravessa é composta por Campos de altitude, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa (Coelho, 2009) abrangendo os biomas de Mata atlântica e Cerrado. A região é predominantemente de clima tropical de savana (Cerrado) de acordo com a classificação de Köppen, caracterizado por ser uma região tropical úmida com inverno seco (Reboita et al., 2015). Há predomínio de duas classes de solos na bacia, Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico e/ou Álicos e Argissolo (Poszólico) Vermelho-Amarelo (Embrapa, 1999).

Os afluentes do Rio Doce possuem um complexo de sistemas lacustres profundos e rasos no médio e baixo Rio Doce (Meis & Tundisi, 1986; Barroso, 2007), que influenciam constantemente na drenagem e sedimentação da bacia. Ao longo do Rio Doce, no território do Estado de Minas Gerais, o fluxo médio da água é de aproximadamente 900 m³/s. A partir da divisa com o Espírito Santo até a sua foz, há um menor volume de água bruta, pois a área possui menor abrangência e captação de águas precipitadas, a presença de dois reservatórios para geração de energia e a grande demanda de captação de água para agricultura e para atender as necessidades urbanas (Coelho, 2009). Quando o Rio Doce alcança o oceano, seu sedimento influencia o banco dos Abrolhos, uma extensão da Plataforma continental que abriga formações de recifes de extrema importância no Oceano Atlântico, além dos extensos bancos de rodolitos, formados por algas e reconhecido como a maior extensão contínua de bancos de rodolitos do mundo (Quaresma et al., 2015).

A atividade econômica da bacia do Rio Doce é bastante diversificada, destacando-se a agropecuária, agroindústria sucroalcooleira, a mineração (ferro, ouro, bauxita, manganês, pedras preciosas e outros), a indústria (celulose, siderurgia e laticínios), o comércio e serviços de apoio aos complexos industriais e a geração de energia elétrica (ANA, 2020). Dentre os municípios que estão inseridos na bacia, mais de 85% desses possuem até 20 mil habitantes, e apenas dois possuem população superior a 200.000 habitantes, Governador Valadares e Ipatinga, localizados junto ao canal principal do Rio Doce (Coelho, 2009). Uma das principais fragilidades dos centros urbanos está relacionada aos sistemas insuficientes de tratamento de esgoto em relação à demanda (Consórcio ECOPLAN-LUME, 2010), sendo os canais dos rios receptores e transportadores de rejeitos e efluentes (CBH DOCE, 2020).

Historicamente a bacia possui ampla atividade de mineração nos últimos três séculos, vinculado principalmente a extração de ouro e extração e processamento do minério de ferro (Costa et al., 2003; Castro et al., 2011; Cavalcanti et al., 2021). O Quadrilátero Ferrífero é uma região de relevo acidentado, localizado na região do alto Rio Doce, ao longo do qual se distribuem grandes depósitos de minério com alto teor de ferro. Esta região é composta por quatro associações principais de rochas de importância extrativista para a região: rochas gnáissicas e granitos, xistos verdes e rochas metamórficas que hospedam grandes depósitos auríferos (Lobato et al., 1998), rochas metamórficas como itabiritos que hospedam grandes quantidades dos minérios de ferro (Rosière & Chemale Jr., 2000; Rosière et al., 2008) e grupo Itacolomi composta por

quatzitos e metaconglomerados (Door, 1969).

Apesar do PIB *per capita* do estado estar relacionado intrinsicamente as atividades de mineração e indústrias vinculadas ao setor da extração de minérios, há um passivo ambiental importante a ser dimensionado, principalmente depois de desastres ambientais provocados pelo rompimento da barragem de rejeitos do processo de extração de minério de ferro, Fundão, localizada em Mariana (MG), no dia 5 de novembro de 2015. A lama e resíduos de rejeito, de mais de 40 milhões de m³, atingiu as povoações de Bento Rodrigues e Barra Longa nas margens no rio Gualaxo do Norte; passou pelo rio do Carmo, atingiu o Rio Doce e, percorreu aproximadamente 660 km, até atingir o mar em Regência, Município de Linhares (ES) (ANA, 2020). O rápido deslocamento da massa de rejeito teve como consequência a redução da cobertura vegetal, erosão, assoreamento, escoamento e descarga dos efluentes domésticos e agrícolas e o revolvimento do sedimento depositado na calha do rio durante centenas de anos (Da Silva Junior et al., 2018; Santos et al., 2019; Duarte et al., 2020).

Após o rompimento da barragem, várias pesquisas vêm mostrando a presença e persistência de diferentes metais e metaloides ao longo da bacia, como alumínio, arsênio, bário, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, crômio, escândio, ferro, magnésio, manganês, mercúrio, niquel, selênio, titânio, vanádio e zinco (Guerra et al., 2017; Santos et al., 2019; Dos Reis et al., 2020; Fraga et al., 2020; De Matos et al., 2022; Mulholland et al., 2022; Yamamoto et al, 2023b), depositados no sedimento, solo do entorno ou coluna d'água do rio. Estes elementos, essenciais e principalmente os não-essenciais, podem apresentar potencial tóxico dependendo das concentrações biodisponíveis (Martinez-Finley et al., 2012).

A deposição de metais nos corpos d'agua pode ocorrer por influxo de água subterrânea, escoamento superficial, advindas de fontes naturais ou atividades humanas (Rosen & Van Metre, 2010; Silva et al., 2018; Duarte et al., 2020). A biodisponibilidade em ambientes aquáticos, ou seja, a quantidade de produto químico que está disponível para causar uma resposta biológica (NRC, 2003), depende de múltiplos fatores físico-químicos como temperatura, pH e potencial redox, (Hong et al., 2011; Adams et al., 2019). A absorção dos metais nos organismos bentônicos ocorre majoritariamente por ingestão (Hare et al., 2003).

Entre os organismos bentônicos estão os insetos, onde na sua hemolinfa os metais essenciais são eletrólitos, atuando como íons, permitindo a passagem de corrente elétrica, e tem papel importante nos processos osmorregulatórios, equilíbrio ácido-base,

sinalização celular (Zheng et al., 2020) e também se ligando a diferentes proteínas como hemoglobina, catalase e superóxido dismutase (Locke & Nichol, 1992; Martinez-Finley et al., 2012).

Os metais não-essenciais e metaloides, por sua vez, não têm papel funcional dentro dos organismos e geralmente causam maior toxicidade que os elementos essenciais mesmo em baixas concentrações (Ali et al.,, 2019). Eles são transportados para o interior das células por proteínas carreadoras por possuírem cargas semelhantes aos íons essenciais (Beaty et al., 2002; Martinez-Finley et al., 2012; Belowitz & O'Donnell, 2013; Leonard et al., 2018).

Dentre os efeitos tóxicos dos metais mais relatados na literatura, pode-se citar os danos por estresse oxidativo, gerados por espécies reativas de oxigênio (EROS) formadas durante o metabolismo (Mendikute & Cajaraville, 2003) e potencializadas com a presença de metais através da reação de Fenton e Haber-Weiss (Locke & Nichol, 1992). Os ânions superóxidos (O2\*-) levam à produção de radicais hidroxila (OH\*-) (Fridovich, 1995). Os radicais hidroxila, são altamente reativos, oxidando os lipídeos da membrana e desnaturando proteínas e ácidos nucléicos (Lesser, 2006), entretanto são rapidamnete reduzidos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que são menos reativos, permanecendo mais tempo livres na célula, causando estresse oxidativo e, podendo subsequentemente, a longo prazo, ocasionar danos em níveis mais elevados da organização biológica, como as alterações morfológicas e fisiológicas (De Almeida et al., 2007; Costantini, 2008; Fan et al., 2012).

Na bacia do Rio Doce, estudos prévios relataram alterações na atividade de enzimas antioxidantes em peixes expostos a metais, além de diferentes alterações morfológicas, histológicas e genotóxicas (Coppo et al., 2018; Gomes et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Macêdo et al., 2020; Passos et al., 2020; Weber et al., 2020; Merçon et al., 2021; Merçon et al., 2022; Vieira et al., 2022; Yamamoto et al. 2022a), comportamentais em anuros (Girotto et al., 2020), na ecologia de microrganismos (Giongo et al., 2020; Zorzal-Almeida & Fernandes, 2021) e na toxicidade de microcrustáceos (Mendes et al., 2020). Entretanto, há uma lacuna de pesquisas de toxicidade dos sedimentos em organismos bentônicos na bacia.

Estudos na bacia do Rio Doce vem mostrando também a presença de contaminantes orgânicos na calha do rio, como produtos farmacêuticos, herbicidas (Gomes et al., 2022), compostos fenólicos (Ramos et al., 2021), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e piretroides (Yamamoto et al., 2023b). Dentre as possíveis fontes

dos contaminantes orgânicos, que podem ser sintéticos ou naturais, podem ser citados os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, pesticidas, produtos veterinários, compostos/subprodutos industriais, aditivos alimentares, nanomateriais de engenharia (Lapworth et al., 2012). Também podem ser gerados a partir da combustão incompleta ou pirólise de matéria orgânica (CETESB, 2018) presentes em carvão, petróleo e derivados, apresentando diferentes formas de persistência no ambiente dependendo da conformação estrutural da molécula (Warren et al., 2003).

Nos ambientes aquáticos compostos orgânicos podem ser transformados em outros compostos por um conjunto complexo de reações físico-químicas (fotólise, hidrólise, oxidação, redução) e mecanismos biológicos como a biodegradação aeróbica (Mackay et al., 1985; Warren et al., 2003; Mompelat et al., 2009). Semelhantemente aos metais a biodisponibilidade de substâncias orgânicas depende das condições físico-químicas ambientais (Akkanen et al., 2012) como a temperatura, pH, remobilização do elemento por fatores naturais ou antropogênicos (Eggleton & Thomas, 2004) e suas propriedades físico-químicas inerentes. Por exemplo, sua maior afinidade por lipídios (hidrofobicidade) reflete numa maior tendência a associação aos sedimentos e, assim estão mais susceptíveis a ingestão em organismos bentônicos (Gaskell et al., 2007), além de terem mais facilidade de absorção pela membrana plasmática.

Contaminantes orgânicos biodisponíveis (Eggleton & Thomas, 2004) são absorvidos pelos organismos e, podem desencadear mecanismos internos que atuam como agentes de biotransformação gerando compostos mais hidrossolúveis e excretáveis (Livingstone, 1998). Contudo a transformação em intermediários ainda mais reativos pode ocorrer frequentemente (Anders, 2008), os quais por sua vez podem ser biotransformados novamente ou podem ocasionar efeitos adversos como a desregulação endócrina (Petrovic et al., 2001; Campos et al., 2019), danos no DNA (Park & Choi, 2009, Martínez-Paz et al., 2013), bioacumulação principalmente em tecidos lipofílicos (Connell, 1988; Dussault et al., 2009; Nybom et al., 2016) e no caso de inseticidas, como os piretroides, atuando em sítios-alvo específicos no interior do inseto.

Um dos grupos orgânicos mais estudados quanto à toxicidade são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Estes compostos possuem dois ou mais anéis aromáticos, tem origem natural ou antrópica podendo ser pirogênica ou petrogênica, ocorrem na atmosfera predominantemente na fase de vapor, ou estão amplamente ligados a partículas (Girardin et al., 2020). São também conhecidos por seu potencial de bioacumulação, além de carcinogênico e mutagênico. Os vertebrados aquáticos

metabolizam estes compostos, mas reativos intermediários podem causar adutos de DNA (Pampanin & Sydnes, 2013). Nos invertebrados pouco se conhece sobre a atuação, mas alguns estudos indicam que podem estar relacionados com mecanismos de biotransformação e eliminação pela ecdise (Jørgensen et al. 2008, Girardin et al., 2020).

Neste cenário, o sedimento é componente fundamental dos ecossistemas aquáticos por causa do nicho fornecido para uma variedade de organismos aquáticos, incluindo espécies economicamente relevantes sob o aspecto antrópico, bem como espécies que desempenham um papel fundamental na cadeia alimentar (Burton et al., 2003; Martínez-Jerónimo et al., 2008; Dornfeld et al. 2019).

Os invertebrados aquáticos são considerados organismos modelo para testes de toxicidade ambiental em consequência ao ciclo de vida relativamente curto e elevada densidade populacional, possibilitando estabelecer a relação entre a presença de poluentes e os efeitos letais e subletais em diferentes níveis de organização biológica (Marinković et al., 2011; OECD, 2011) e do destino (metabolização e acumulação) destes compostos (Johnson et al., 1993).

Dentre os insetos aquáticos, espécies de Chironomidae (Diptera) são comumente utilizados em estudos de toxicidade associado ao sedimento. O táxon é amplamente distribuído globalmente (Pinder, 1986), ocupando ambientes de águas continentais, salobras, marinhas, totalmente terrestres, suportando condições extremas de temperatura e altitude (Linevich, 1971; Koshima, 1984; Edwards & Usher,1985; Hayford et al., 1995; Ferrington, 2007). Certos grupos são característicos de ambientes tanto lênticos como lóticos e podem ser o grupo mais abundante nesses ambientes (Oliver, 1971; Pinder, 1986). Estão associados a sedimentos ricos em detritos orgânicos e no caso de ambientes com elevada concentração de efluentes, podem ser os únicos insetos (Trivinho-Strixino, 2011).

As larvas dos chironomideos são importantes recicladores de matéria orgânica, são metabolicamente ativas e por isso apresentam maior nível de repostas ao estresse ambiental. Muitas espécies possuem a capacidade de obter o oxigênio dissolvido na água através da superfície do corpo e armazenar nas moléculas de hemoglobina presentes no fluido corpóreo (hemolinfa). Sendo assim, esses organismos podem tolerar baixas concentrações de oxigênio na água (Trivinho- Strixino, 2011) e sobreviver durante condições desfavoráveis (Osmulski & Leyko, 1986; Costa et al., 2008; Pillot, 2009). Outra capacidade extraordinária que apresentam é a metabolização de xenobióticos através de suas hemoglobinas (Weber& Vinogradov, 2001; Ha & Choi, 2008).

Representantes do gênero *Chironomus*, como *Chironomus santicaroli* para as regiões neotropicais, vivem em ambientes dulciaquícolas nos estágios de ovo, larvas e pupa, sendo os adultos alados terrestres. Os ovos são normalmente depositados na água, próximo às margens, recobertos por uma matriz gelatinosa protetiva, e estão arranjados em forma espiral, variando em quantidade. Apresentam quatro instares larvais que se alojam no sedimento, sendo este estágio o mais longo em relação ao tempo de vida do organismo. Os quatro instares larvais são separados pelo tamanho da capsula cefálica (Richardi et al., 2013). O estágio de pupa é breve e a característica mais proeminente neste estágio é um órgão respiratório multifilamentoso e plumoso externo denominado corno torácico, conectado diretamente com o sistema traqueal (Cranston, 1995). Quando o desenvolvimento está completo, a pupa alcança a superfície da água, onde o adulto emerge (Fig. 1). Os adultos possuem dimorfismo sexual e vivem poucos dias, apresentam aparato bucal reduzido e não se alimentam.

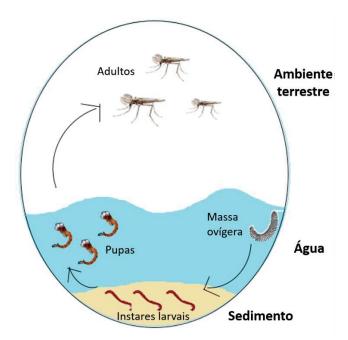


Figura 1. Ciclo de vida de Chironomus sancticaroli.

As larvas de *C. sancticaroli* permanecem geralmente enterradas nos primeiros centímetros do sedimento em tubos nos quais, por movimentos constantes do corpo, conseguem realizar as trocas gasosas pela cutícula e por um sistema traqueal fechado (Pinho, 2008). Além disso, com uma substância pegajosa produzida pelas glândulas salivares (Oliver, 1971) ressuspendem e capturam partículas orgânicas para alimentação.

Para compreender os impactos dos compostos químicos na avaliação da

qualidade ambiental e nos organismos vivos é necessário não somente detectar a presença dessas substâncias no ambiente, mas mensurar as interações entre estes químicos e os organismos expostos (Freire et al., 2008).

Dentro dos organismos a mensuração da bioconcentração e bioacumulação dos compostos permite correlacionar a concentração dos xenobióticos no organismo com os níveis encontrados no sedimento (Kiffney & Clements, 1993). Apesar de diferentes definições para os termos, a bioconcentração pode ser definido como a concentração do composto ou conjunto deles dentro do organismo resultante do contato com o meio (Barboza et al., 2018). Já a bioacumulação pode ser definida como o acúmulo desses compostos, dentro das células/tecidos após os processos de absorção, distribuição, armazenamento e excreção (Barboza et al., 2018). Dependendo do meio de entrada, diferentes contaminantes tendem a se acumular em diferentes tecidos. Os metais tendem a se acumular intracelularmente em forma de grânulos (Wallace et al., 2003; Cain et al., 2004), principalmente naqueles tecidos relacionados com altas taxas de trocas iônicas como sistema digestório e excretor nos insetos (Seidman et al., 1986; Krantzberg & Stokes, 1990; Craig et al., 1998; Mogren et al., 2013).

A biodisponibilidade é o fator determinante para avaliar o potencial de atuação desses elementos do ambiente para o interior do organismo. Ainda que estes contaminantes sejam absorvidos para as células, a maioria dos organismos possuem um maquinário de proteínas citosólicas que se ligam em metais como as metalotioneínas (Amiard et al., 2006; Toušová et al., 2016), proteínas intra e extra celulares como ferritinas e transferrinas (Locke & Nichol, 1992) e proteínas transmembrana transportadoras ABC (Song et al., 2014; Zhang et al., 2019) como aquelas de resistência multixenobiótica (MXR) (Moreau et al., 2008; Saez et al., 2008) que desempenham importante papel na eliminação de xenobióticos da célula. Diferenças entre estes mecanismos podem afetar fundamentalmente a sensibilidade das espécies aos metais (Cain et al., 2004) e sua capacidade de evitar danos dentro do organismo.

Uma forma de mensuração de respostas biológicas a diferentes contaminantes é utilizando a análise de biomarcadores. Biomarcadores são definidos como medidas quantitativas de alterações (bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos) no sistema biológico que respondem a exposição de substâncias xenobióticas (Rey et al., 1998; Rey et al.,1999; Lam & Gray, 2003). Estas respostas permitem determinar o grau de impacto e identificar os estressores ou poluentes relacionados a estes efeitos, podendo avaliar mudanças em

maiores níveis de organização biológica (populações, comunidades, ecossistemas) (Freire et al., 2008).

Em nível molecular, poluentes podem interferir na expressão de genes específicos, ligados a respostas toxicológicas de curto prazo que afetam a aptidão individual dos organismos (Lee et al., 2006). Outro mecanismo muito estudado é o dano oxidativo em macromoléculas, como o DNA, representando uma ferramenta rápida e sensível ao estresse ambiental que permite determinar alterações estruturais do material genético, como quebra de fita simples e fita dupla (Lee et al., 2006; Morais et al., 2014; Vicentini et al., 2017).

As alterações bioquímicas podem estar associadas à interferência da atividade de enzimas atuantes em diferentes vias bioquímicas como a transmissão do impulso nervoso, de biotransformação, de defesa ao estresse oxidativo, assim como relacionadas aos danos em biomoléculas (Rakotondravelo et al., 2006; Marinković et al., 2011; Duran et al., 2012; Vicentini et al., 2017).

Análises histológicas objetivam identificar alterações nas células e tecidos de órgãos-alvos (Lavarías et al., 2017), auxiliando na compreensão da fisiologia dos órgãos e sistemas (Richardi et al., 2015). Assim, a expressão morfológica da exposição a um composto tóxico pode ser integrada às mudanças bioquímicas e fisiológicas (Lavarías et al., 2017).

A alteração em menores níveis de organização biológica pode potencialmente desencadear alterações em nível populacional, como consequência das alterações no desenvolvimento dos organismos (tamanho corporal, capacidade de realizar a muda, redução da prole) e assim comprometer a sobrevivência da espécie em ambiente contaminado.

Dentro dos corpos d'água os compostos podem interagir diretamente com a biota por ingestão e contato, ou se depositar nos sedimentos. Quando há mais de uma fonte de efluente alcançando o curso de água é esperado ampla diversidade de poluentes com seus resultados em interações e efeitos complexos (Magalhães & Ferrão Filho, 2008). Para isso, a correlação entre o efluente e a sua toxicidade no ambiente, a partir da aplicação de análises multivariadas entre contaminantes ambientais, bioconcentração e alterações em biomarcadores pode ser poderoso aliado na interpretação dos dados, direcionando para aquelas fontes que contribuem mais para efeitos adversos (Eagleson et al., 1990; Dickson et al., 1992; Vieira et al., 2016; Lunardelli et al., 2018).

Neste cenário, atualmente, existe o desafio de se conhecer os efeitos tóxicos de

misturas complexas em sedimentos sobre os organismos, ocasionadas por fontes diversas de poluição, e o impacto dos xenobióticos sobre o ecossistema. Dessa forma, esta pesquisa buscou trazer informações sobre os efeitos em diferentes níveis de organização biológicas em larvas da espécie neotropical *Chironomus sancticaroli* expostas subcronicamente ao sedimento proveniente de seis pontos ao longo do alto, médio e baixo Rio Doce, que receberam os rejeitos da barragem do Fundão além de diferentes fontes de poluição. Para isto a tese está dividida em dois capítulos: Capítulo I: Múltiplas fontes de poluentes que alcançam a bacia do Rio Doce e seu impacto na biologia de Diptera (Chironomidae) bentônico; Capítulo II: Alterações bioquímicas, moleculares e histológicas em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) expostos ao sedimento da bacia do Rio Doce sujeitos a complexa fonte de poluentes.

# 1.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição subcrônica ao sedimento da bacia do Rio Doce, MG/ES imaturos de *Chironomus sancticaroli*, para estabelecer uma associação entre a presença dos contaminantes e as potenciais respostas biológicas desencadeadas.

#### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

# Capítulo I:

- Verificar a toxicidade dos contaminantes presentes nos sedimentos de diferentes localidades ao longo do Rio Doce em *Chironomus sancticaroli* através dos parâmetros de sobrevivência larval e tempo de desenvolvimento após exposição subcrônica.
- Analisar alteração no estágio desenvolvimento larval através da mensuração do tamanho das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao sedimento, em bioensaio de toxicidade subcrônica.
- Averiguar a bioconcentração de metais biodisponíveis para as larvas de Chironomus sancticaroli expostas ao sedimento da bacia do Rio Doce, em bioensaio detoxicidade subcrônica.

# Capítulo II:

- Verificar alterações nas enzimas de biotransformação α e β esterases e

glutationa S-transferase em *Chironomus sancticaroli* expostos de forma subcrônica aos sedimentos de diferentes localidades da bacia do Rio Doce.

- Analisar potenciais alterações no sistema de defesa antioxidante através das atividades enzimáticas da superóxido dismutase e catalase em *Chironomus* sancticaroli expostos de forma subcrônica aos sedimentos de diferentes segmentos da bacia do Rio Doce.
- Avaliar potenciais danos oxidativos em biomoléculas através da análise de peroxidação lipídica e danos no DNA em *Chironomus sancticaroli* expostos de forma subcrônica aos sedimentos de diferentes localidades da bacia do Rio Doce
- Verificar potenciais efeitos neurotóxicos através da alteração na atividade enzimática da acetilcolinesterase em *Chironomus sancticaroli* expostos subcronicamente aos sedimentos de diferentes localidades da bacia do Rio Doce.
- Analisar os níveis de expressão gênica das isoformas de hemoglobina C e E,e da metalotioneina das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce, em bioensaio de toxicidade subcrônica.
- Compreender a relação entre os diferentes poluentes da bacia do Rio Doce e as respostas causadas em biomarcadores bioquímicos e moleculares através de análises estatísticas multivariadas
- Avaliar os efeitos histopatológicos no sistema digestório, corpo gorduroso e órgãos relacionado a trocas iônicas de larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce.
- Analisar a associação dos efeitos histopatológicos com as análises físicoquímicas do sedimento através de análise multivariada.

#### 2. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

# 2.1. Caracterização da Bacia do Rio Doce

A bacia hidrográfica do Rio Doce está localizada no sudeste do Brasil e possui área de drenagem de 86.715 km², dos quais 86% estão no Leste de Minas Gerais e 14% no Nordeste do Espírito Santo. O rio principal da bacia é o Rio Doce e tem extensão de 879 quilômetros. Historicamente a bacia possui ampla atividade de mineração nos

últimos três séculos, vinculado principalmente a extração de ouro e extração e processamento do minério de ferro. Além do mais o Rio Doce atravessa centros industriais e urbanos que possuem sistemas insuficientes de tratamento de esgoto. Em 2015 a bacia foi fortemente impactada pelo rompimento da barragem de rejeitos do processo de extração de minério de ferro, Fundão, localizada em Mariana (MG) que percorreu toda a extensão do curso principal do Rio Doce até desaguar no Oceano Atlântico.

# 2.2. Amostras do sedimento do Rio Doce

Foram estabelecidos seis locais (Fig. 2) de coleta de sedimento ao longo da bacia do Rio Doce, a jusante do ponto de ruptura da barragem do Fundão, localizados no Estado de Minas Gerais e Espírito Santos: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV) e Aimorés (AIM).

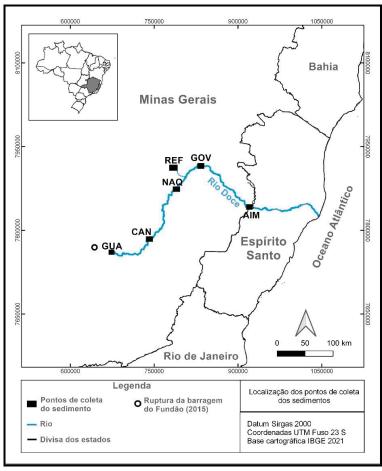


Figura 2. Mapa com a localização dos seis pontos de coleta ao longo da bacia do Rio Doce. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ),

Referência(REF), Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: Aimorés (AIM). No mapa está indicado o local de ruptura da barragem fundão em 2015 e os limites do território dos estados.

Os locais de coleta foram selecionados pela influência de diferentes impactos antrópicos nas três regiões do Rio Doce (alto, médio e baixo) e por estarem relativamente equidistantes ao longo do percurso do rio (Tab. I)

Tabela I. Localização e características dos pontos de coleta de sedimentos ao longo da bacia do Rio Doce de acordo com as três regiões: Alto, médio e baixo, acompanhado do nome do munícipio da área de influência, coordenadas geográficas e as principais atividades antrópicas para cada região da Bacia nas proximidades do ponto de coleta.

Região	Pontos de coleta do	Coordenadas	Atividades humanas ao longo da	
3	sedimento	geográficas	bacia	
	1- Rio Gualaxo do Norte	20°16'44.9"S	Intensa atividade de mineração,	
Alto Rio	( <b>GUA</b> ), Mariana, MG	43°25'50.2"W	local em que ocorreu o rompimento	
Doce	2- Reservatório de Candonga ( <b>CAN</b> ), Rio Doce, MG	20°12'24.1"S 42°52'39.7"W	da Barragem do Fundão em Mariana, MG e reservatório onde milhões de metros cúbicos de rejeito passaram para o Rio Doce.	
	3 – Naque ( <b>NAQ</b> ), MG	19°14'37.5"S	Localizado na região do vale do	
		42°19'09.1"W	aço região onde se encontram muitas indústrias e o maior centro	
Médio	4 – Local referência	19°01'31.0"S	urbano do Rio Doce, recebendo	
Rio	( <b>REF</b> ), Rio Corrente	42°09'37.3"W	efluentes domésticos com baixo	
Doce	Grande, Periquito, MG		índice de tratamento de esgoto.	
	5 - Governador Valadares	18°51'22.0"S	O local referência não sofreu	
	( <b>GOV</b> ), MG	41°55'49.5"W	impacto dos rejeitos de minério de	
			ferro com o rompimento da	
			barragem do Fundão.	
Baixo	6 – Aimorés (AIM), ES	19°30'25.0"S	Atividades relacionadas à	
Rio Doce		41°00'53.5"W	agricultura e pecuária	

As coletas dos sedimentos foram realizadas nos seguintes períodos: a) No mês de julho em pontos de coleta do estado de Minas Gerais: 10/07/2019 - 20/07/2019) e agosto: 12/08/2019 - 20/08/2019, em Aimorés no estado do Espírito Santo). As atividades de campo foram realizadas em parceria com o Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da Universidade Estadual Paulista sob supervisão do Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa.

Foram coletadas três amostras de sedimento por ponto de coleta (500 g de sedimento por amostra totalizando 1.500 g por ponto de coleta), a 10 m de distância da margem do rio e profundidade de aproximadamente até 15 cm do fundo do rio. As amostras foram armazenadas a 4 °C até a realização dos bioensaios, não ultrapassando o período de 60 dias recomendado pela ABNT NBR 15.469 (ABNT, 2007) para armazenamento de sedimento para a realização de ensaios de toxicidade.

# 2.3. Análises químicas

Dados das análises químicas do sedimento (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sc, Ti, V, Zn, HPAs e piretroides) coletado foram obtidos por Yamamoto et al. (2023b) e utilizados para estabelecer uma relação da presença dos contaminantes inorgânicos e orgânicos no sedimento com as concentrações bioacumuladas nos organismos expostos.

# 2.3.1. Colônia de *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE)

Os organismos utilizados nos bioensaios foram provenientes da colônia de *Chironomus sancticaroli* mantida no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC²) (Setor de Ciências Biológicas/Departamento de Zoologia) em condições controladas de temperatura (25°C ± 2°C) e fotoperíodo (12/12 horas), com aeração constante.

A criação seguiu o protocolo de Vicentini et al. (2017), sendo mantida em dois aquários de vidro de 25 cm x 15 cm x 25 cm, com capacidade para 10 L, contendo aproximadamente dois centímetros de areia e sete litros de água. Em relação à água houve a seguinte modificação: de água desclorada para água reconstituída (Solução de estoque I (1,5 g de sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>); 1000 ml água destilada e solução de estoque II (0,2 g de cloreto de potássio (KCI); 4,8 g de carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>); 6,1 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1000 ml água destilada). Essa proporção foi ajustada para os parâmetros de dureza de 16 mg.L<sup>-1</sup>; pH entre 7,2 e 7,6 e condutividade de 160 μS/cm.

A alimentação foi administrada três vezes por semana com a adição de 2,5 g de ração canina triturada (Dog Chow®). Vouchers dos espécimes da colônia foram depositados na Coleção Padre Jesus de Santiago Moure (DZUP) números de acesso 249269 a 249276.

# 2.4. Teste de sensibilidade da colônia matriz *Chironomus sancticaroli*.

A homogeneidade e sensibilidade das respostas da colônia de *C. sancticaroli* foram determinadas utilizando o teste de sensibilidade ao KCI (Cloreto de potássio) seguindo o protocolo de Dornfeld (2006). Um teste de sensibilidade dos imaturos de *Chironomus sancticaroli* foi realizado a cada mês durante os bioensaios, totalizando dois testes nos meses de agosto e setembro de 2019.

Larvas de quarto instar foram expostas a concentrações de 1,5 g.l<sup>-1</sup>; 2,25 g.l<sup>-1</sup>;3,5 g.l<sup>-1</sup>; 5,0 g.l<sup>-1</sup> e 7,5 g.l<sup>-1</sup> de KCI e controle (apenas água reconstituída), em condições de temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12/12 horas, por 48 horas. Os testes foram realizados em frascos de vidro de 300 ml com volume de solução de 200 ml (solução de KCI + água reconstituída). Para cada concentração foram expostas quatro réplicas, contendo seis larvas em cada frasco, totalizando 24 larvas. No início do teste foram adicionados 250 µl de ração líquida (20 g ração de peixe triturada (Tetramim®) para 1000 ml de água destilada) para alimentação. No início e no final de cada teste foi realizada a leitura dos parâmetros de condutividade, pH e temperatura das condições controle e na concentração 7,5 g.l<sup>-1</sup> de KCI.

O resultado do teste de sensibilidade foi analisado segundo o método de *Trimen Spearman-Karber*. Em média as CL<sub>50</sub> apresentaram valor de 4,34 g.L<sup>-1</sup> com coeficiente de variação de 25,41 %. O coeficiente de variação indica a padronização da metodologia e a confiança dos resultados obtidos de acordo com a *Environmental Canada* (1990) que estabelece variação ideal para o coeficiente ≤ 30 %.

#### 2.5. Bioensaios de toxicidade

# 2.5.1.Condições dos bioensaios

Os bioensaios de toxicidade foram realizados com base no protocolo da OECD 235 (2011) com as seguintes modificações: fotoperíodo de 16/8 horas claro e escuro para 12/12 horas claro e escuro. A temperatura foi mantida em 25°C ± 2°C e umidade 80% ± 10% (Trivinho-Strixino & Strixino, 1982).

Os bioensaios foram escalonados em dois agrupamentos, o primeiro expondo as larvas aos sedimentos dos pontos: GUA, CAN e NAQ, o segundo aos pontos REF, GOV e AIM. Para cada bioensaio foi utilizado um controle próprio, utilizando como substrato

337,5 g de areia de quartzo branco (Sigma. CAS: 14808-60-7, 50-70 Mesh), 90 g de caulinita (Farmanilquima. Lote: F 2725) e 22,5 g de turfa, sendo adicionado 700ml de água reconstituída.

# 2.5.2. Exposição subcrônica

Para exposição subcrônica foi utilizado intervalo de oito dias adequado à biologia de *C. sancticaroli* e de acordo com os critérios da OPPTS 850.1790 (EPA, 1996).

Para os bioensaios, massas ovígeras recém ovipostas (tempo inferir a 24 horas) foram retiradas da colônia matriz de *C. sancticaroli* e mantidas em frascos de vidro com 100 ml de água reconstituída, em temperatura de 25°C ± 1°C, fotoperíodo de12/12 horas claro e escuro e umidade a 80% ± 10%. Após 72 horas, as larvas em instar I (Fig. 3) foram separadas sob microscópio estereoscópio e expostas aosedimento.



Figura 3. Larva de Chironomus sancticaroli em íntar I.

Os bioensaios foram realizados em aquários de vidro (10 cm x 21 cm x 10,5 cm), contendo 450 g de sedimento homogeneizado proveniente da bacia do Rio Doce com adição de 700 mL de água reconstituída que foram mantidas sob aeração constante por 24 horas antes do início do bioensaio para estabilização do sedimento. No início do bioensaio foi adicionado ração líquida (25 g ração Tetramin®; 1000 ml de água destilada), proporcional ao volume final de 700 ml por aquário, os quais foram mantidos cobertos por uma rede de malha fina e com aeração constante em câmara de germinação do tipo BOD. Para os ensaios foram expostas 300 larvas por ponto de coleta e grupo controle, divididas em grupos de três réplicas, cada uma com 100 indivíduos por aquário, totalizando 2.400 larvas expostas (6 pontos do Rio Doce + 2 grupos controles).

A alimentação foi administrada com ração líquida, adicionando-se 0,012 mg por larvas a cada 48 horas.

Os organismos de cada ponto amostral foram contabilizados quanto à sobrevivência e estágio de desenvolvimento (larva, pupa ou adulto). As larvas das três réplicas de cada ponto foram unidas e aleatoriamente armazenadas dentro de microtubos de 1,5 ml em ultra-freezer a -80°C para análises posteriores de atividade enzimática, danos em biomoléculas e expressão gênica (n = 10 por ponto da bacia do Rio Doce controle), bioconcentração (n = 30 por ponto da bacia do Rio Doce e controle), em álcool 80% para análise de desenvolvimento da cápsula cefálica (n = 20 por ponto da bacia do Rio Doce e controle) e em solução duboscq (24h) e álcool 70% para análises histológicas (n = 10 por ponto da bacia do Rio Doce e controle).

No início e no final de cada bioensaio os seguintes parâmetros físico-químicos da água foram aferidos: oxigênio dissolvido (O.D), pH, condutividade (Cond), produtos sólidos totais (TDS), salinidade (Sal) e temperatura da água (Tº água) (Tab. II).

Tabela II. Dados dos parâmetros físico-químicos da água, no momento inicial e final dos bioensaios, onde foram utilizados sedimentos dos seis pontos de coleta ao longo da bacia do Rio Doce. Controle (C). Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Rio referência (REF), Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: Aimóres (AIM).

Ponto	O.D	Ph	Cond. (uS)	TDS (mg/L)	Sal. (ppm/S)	Tº água
				(9/	Início	
С	5.7 ± 0.8	$7.0 \pm 0.3$	123.2 ± 4.5	86.8 ± 5.3	58.8 ± 3.5	24.7 ± 0.0
GUA	$5.6 \pm 0.0$	$7.0 \pm 0.0$	87.1 ± 4.2	60.9 ± 3.1	41.1 ± 2.2	$25.2 \pm 0.1$
CAN	$5.4 \pm 0.2$	$6.9 \pm 0.1$	103.8 ± 11.5	72.2 ± 7.4	49.0 ± 5.8	$24.6 \pm 0.2$
NAQ	$5.4 \pm 0.1$	$6.7 \pm 0.1$	95.7 ± 0.2	67.8 ± 1.4	45.6 ± 0.5	$25.9 \pm 0.1$
С	$5.3 \pm 1.0$	$6.4 \pm 0.1$	191.2 ± 71.0	124.6 ± 29.6	83.7 ± 18.9	$23.1 \pm 0.2$
REF	$4.8 \pm 0.3$	$6.6 \pm 0.1$	111.7 ± 1.3	78.1 ± 0.7	$53.1 \pm 0.7$	22.6± 0.0
GOV	$5.0 \pm 0.3$	$6.5 \pm 0.1$	162.0 ± 6.8	111.6 ± 5.6	$74.2 \pm 2.9$	$22.6 \pm 0.3$
AIM	$5.0 \pm 0.3$	$6.6 \pm 0.1$	134.0 ± 3.8	96.6 ± 2.7	66.8 ± 1.7	$23.1 \pm 0.2$
					Final	
С	4.1 ± 0.6	6.9 ± 0.1	203.6 ± 3.2	154.1 ± 15.0	124.3 ± 20.9	24.0 ± 0.1
GUA	$4.0 \pm 0.3$	$7.4 \pm 0.1$	293.3 ± 34.0	190.6 ± 36.5	190.6 ± 36.5	$23.5 \pm 0.1$
CAN	$4.1 \pm 0.4$	$6.9 \pm 0.1$	$227.3 \pm 4.6$	157.3 ± 3.0	106.6 ± 3.2	$23.1 \pm 0.2$
NAQ	$3.5 \pm 0.2$	$7.0 \pm 0.1$	210.7 ± 10.8	148.1 ± 10.1	98.8 ± 5.5	$23.4 \pm 0.1$
С	$3.9 \pm 0.3$	$6.7 \pm 0.1$	381.6 ± 38.0	266.0 ± 26.6	183.0 ± 19.0	$24.1 \pm 0.0$
REF	$3.9 \pm 0.2$	$7.0 \pm 0.0$	233.6 ± 10.6	156.3 ± 8.0	107.6 ± 5.7	$23.6 \pm 0.0$
GOV	$3.8 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.0$	306.3 ± 14.1	185.0 ± 49.3	151.6 ± 6.3	$24.2 \pm 0.2$
AIM	$4.1 \pm 0.0$	$6.8 \pm 0.1$	$301.6 \pm 47.8$	216.0 ± 35.3	141.0 ± 24.5	$24.0 \pm 0.0$

Legenda: Oxigênio dissolvido (O.D), pH, condutividade (Cond), produtos sólidos totais (TDS), salinidade (Sal) e temperatura da água (Tº água)

# REFERÊNCIAS

ABNT. NBR 15.469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2007. pp. 7

Adams, W.; Blust, R.; Dwyer, R.,; Mount, D.; Nordheim, E.; Rodriguez, P. H.; Spry, D. 2019. Bioavailability Assessment of Metals in Freshwater Environments: A Historical Rev. Environ. Toxic. and Chem., 39(1): 48–59. doi:10.1002/etc.4558

Akkanen, J.; Slootweg, T.; Mäenpää, K..; Leppänen, M. T.; Agbo, S.; Gallampois, C.; Kukkonen, J. V. K. 2012. Bioavailability of Organic Contaminants in Freshwater Environments. Emerging and Priority Pollutants in Rivers. The Hand. of Environ. Chem., vol 19. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-25722-3 2

Ali, H.; Khan, E.; & Ilahi, I. 2019. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation.J. of Chem., 2019: 1–14. doi:10.1155/2019/6730305

Amiard, J.; Amiardtriquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxic., 76(2): 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015

ANA, disponível em\_<a href="https://www.ana.gov.br/sala-de-situacao/rio-doce/rio-doce-saiba-mais">https://www.ana.gov.br/sala-de-situacao/rio-doce/rio-doce-saiba-mais</a> Acessado em 25/05/2023.

Anders, M. W. 2008. Chemical Toxicology of Reactive Intermediates Formed by the Glutathione-Dependent Bioactivation of Halogen-Containing Compounds. Chem. Res. in Toxic., 21(1): 145–159. doi:10.1021/tx700202w

Barboza, L.G.A.; Vieira, L.R.; Branco, V.; Carvalho, C.; Guilhermino, L.. 2018. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. Sci. Rep., 8: 15655. doi:10.1038/s41598-018-34125-z

Barroso, G. F. Lagoas costeiras do Espírito Santo: perspectivas para conservação. In: Menezes, Luiz Fernando, et al., (orgs). Ecossistemas costeiros do Espírito Santo: conservação e restauração. Vitória, EDUFES: 71-86. 2007

Beaty, B. J.; Mackie, R. S.; Mattingly, K. S.; Carlson, J. O.; Rayms-Keller, A. 2002. The Midgut Epithelium of Aquatic Arthropods: A Critical Target Organ in Environmental Toxicology. Environ. Health Pers., 110(6):911-914. doi:10.1289/ehp.02110s6911

Belowitz, R.; O'Donnell, M. J. 2013. Ion-selective microelectrode measurements of TI+and K+ transport by the gut and associated epithelia in *Chironomus riparius*. Aquatic Toxic., 138-139: 70–80. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.013

Burton Jr, G.A.; Denton, D.L.; Ho, K.; Ireland, D.S. 2003. Sediment toxicity testing: issues and methods. In: Hofman DJ, Rattner GA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (eds) Handbook of ecotoxicology. Lewis Publishers, New York, pp 111–150.

Cain, D. J.; Luoma, S. N.; Wallace, W. G. 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. Environ. Toxic. and Chem., 23(6): 1463. doi:10.1897/03-291

Campos, D.; Silva, A. R. R.; Loureiro, S.; Grabicová, K.; Staňová, A. V.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2019. Two-generational effects of Benzophenone-3 on the aquatic midge *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ., 669: 983-990. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.023

Castro, P. T. A.; Nalini Jr, H. A.; Lima, H. M. Entendendo a mineração no Quadrilátero Ferrífero. Belo Horizonte: Ecológico, 2011. pp. 93.

Cavalcanti, J.A.D.; da Silva, M.S.; Schobbenhaus, C.; Lima, H.de M. 2021.Geo- Mining Heritages of the Mariana Anticline Region, Southeast of Quadrilátero Ferrífero-MG, Brazil: Qualitative and Quantitative Assessment of Chico Rei and Passagem Mines. Geoheritage 13: 98. https://doi.org/10.1007/s12371-021-00631-2

CETESB. 2018. Disponível em: <a href="https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/HPAs-Hidrocarbonetos-Polic%C3%ADclicos-Arom%C3%A1ticos.pdf">https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/HPAs-Hidrocarbonetos-Polic%C3%ADclicos-Arom%C3%A1ticos.pdf</a> Acessado em: 25/05/2023

Coelho, A. L. N. 2007. Modelagem hidrológica da bacia do Rio Doce (MG/ES) com base em imagens srtm (shuttle radar topography mission). Caminhos de Geografia, 8(22): 116-131.

Coelho, A. L. N. 2009. Bacia Hidrográfica do Rio Doce (MG/ES): Uma Análise Socioambiental Integrada. Geografares. Vitória, 7:131-146.

Connell, D.W. 1988. Bioaccumulation Behavior of Persistent Organic Chemicals with Aquatic Organisms. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Eds.: Ware, G.W.). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer, New York, New York. doi: 10.1007/978-1-4612-3810-2\_3

Consorcio Ecoplan-Lume, 2010a. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestãode recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce. Contrato Nº 043/2008 – IGAM, Vol. 1, 2010. pp: 472. Disponível em: <www.cbhdoce.org.br>

Coppo, G.C.; Passos, L.S.; Lopes, T.O.M; Pereira, T. M.; Cabral, D. S.; Barbosa, B. V.; Caetano, L. S.; Kampke, E. H.; Chippari-Gomes, A. R. 2018. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Ecotoxicology, 27: 1150–1160. doi: 10.1007/s10646-018-1970-0

Costantini, D. 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. Ecology Letters, 11(11): 1238–1251. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01246.x

Costa, A.T.; Nalini Jr, H.A.; de Lena, J.C.; Mages, M. 2003. Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. Env Geol, 45: 226–235. doi:10.1007/s00254-003-0870-6

- Costa, C. R.; Olivi, P. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova, 31(7):1820-1830.
- Craig, A.; Hare, L.; Charest, P.-M.; Tessier, A. 1998. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). Aquatic Toxic., 41(3): 265–275. doi:10.1016/s0166-445x(97)00085-4
- Cranston, P. The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges. In: Armitage, P., P. S. Cranston & L. C. V. Pinder (Ed.). The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges. London: Chapman & Hall. 1995.
- Da Silva, C. A.; Coutinho, A. D.; de Oliveira-Júnior, J. F.; Teodoro, P. E.; Lima, M.; Shakir, M.; Gois, G.; Johann, J. A. 2018. Analysis of the impact on vegetation causedby abrupt deforestation via orbital sensor in the environmental disaster of Mariana, Brazil. Land Use Policy, 76: 10–20. doi:10.1016/j.landusepol.2018.04.019
- De Almeida, E. A.; Bainy, A. C. D.; Loureiro, A. P. M.; Martinez, G. R.; Miyamoto, S.; Onuki, J.; Barbosa, L. F.; Garcia, C. C. M.; Prado, F. M.; Ronsein, G. E.; Sigolo, C. A.; Bronchini, C. B.; Martins, A. M. G.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage.Comp. Bioc. and Phys. A: Mol. & Int. Phys.,146(4): 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- De Matos, A.R., da Silva, H.T., da Faria, M.C.S.; Freire, B. M.; Batista, B. L.;Rodrigues, J. L. 2022. Environmental disaster in mining areas: routes of exposure to metals in the Doce River basin. Int. J. Environ. Sci. Technol. 19: 12091–12102.doi:10.1007/s13762-022-03981-8
- Dickson, K. L.; Waller, W.T.; Kennedy, J. H.; Ammann, L. P. 1992. Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. Environ. Toxic. Chemi. 11:1307-1322.
- Dornfeld, C. B. Utilização de Chironomus sp (Diptera, Chiromidae) para a Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2006.
- Dornfeld, C. B.; Rodgher, S.; Negri, R. G.; Espíndola, E. L. G.; Daam, M. A. 2019. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a Sensitive Tropical Test Speciesin Laboratory Bioassays Evaluating Metals (Copper and Cadmium) and Field Testing. Arc. of Environ. Cont. and Toxic., 76: 42–50.
- Dorr J.V.N II. 1969. Physiographic, stratigraphic and structural development of the Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. U.S. Geological Survey Professional Paper 641-A, pp. 117.
- Dos Reis, D.A.; Nascimento, L.P.; de Abreu, A.T.; Nalini Jr, a.; Roeser, H. M.P.; Santiago, A. F. 2020. Geochemical evaluation of bottom sediments affected by historicmining and the rupture of the Fundão dam, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res., 27:4365–4375. doi:10.1007/s11356-019-07119-1

- Duarte, E. B.; Neves, M. A.; Benda de Oliveira, F.; Martins, M. E.; Rodrigues de Oliveira, C. H.; Burak, D. L.; Orlando, M. T D.; Gabrig Turbay Range, C. V. 2020. Tracemetals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. Chemosphere, 127879. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127879
- Duran, M.; Michailova, P.; Sari, A.; Ilkova, J.; Sen, A.; Karadurmus, E. 2012. .Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). Acta Zool. Bulga., 64(4):167–173..
- Dussault, È. B.; Balakrishnan, V. K.; Borgmann, U.; Solomon, K. R.; Sibley, P. K. 2009. Bioaccumulation of the synthetic hormone 17α-ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*. Ecotox. Environ. Safety, 72(6): 1635–1641. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.019
- Eagleson, K. W.; Lenat, D. L; Ausley, L. W.; Winborne, F. B. 1990. Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the Cerio *Daphnia dubia* chronic toxicity test. Environ. Toxicol. Chemistry, 9: 1019-1028.
- Edwards, M.; Usher, M. B. 1985. The winged Antarctic midge Parochlus steinenii (Gerke) (Diptera: Chironomidae), in the South Shetland Islands. Biological Journal of the Linnaean Society, 26: 83–93.
- Eggleton, J.; Thomas, K. V. 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. Environ. Inter., 30(7): 973–980. doi:10.1016/j.envint.2004.03.001
- Environmental Canada. 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Environmental Protection Series, Ottawa, Ont., Rept EPS 1/RM/12
- EPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1790 Chironomid Sediment Toxicity Test. Washington: U.S. Environmental Protection Agency; 1996.
- EMBRAPA Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária Sistema Brasileiro de Classi-ficação de Solos. Brasília: EMBRAPA, 1999. pp. 412.
- Fan, W. H.; Cui, M. M.; Shi, Z. W.; Tan, C.; & Yang, X. P. 2012. Enhanced Oxidative Stress and Physiological Damage in *Daphnia magna* by Copper in the Presence of Nano-TiO2. Journ. of Nanomat., 1–7. doi:10.1155/2012/398720
- Ferreira, F. F.; Duca de Freitas, M. B.; Szinwelski, N.; Vicente, N.; Medeiros, L. C. C.; Reynaud Schaefer, C. E. G.; Dergam, J. A.; Sperber, C. F. 2020. Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. Int. Environ. Ass. Manag., 16(5): 622-630. doi:10.1002/ieam.4289
- Ferrington, L.C. 2007. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. In: Balian, E.V., Lévêque, C., Segers, H., Martens, K. (eds) Freshwater Animal Diversity Assessment. Developments in Hydrobiology, vol 198. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-1-4020-8259-7 45

- Fraga, M.D.; Reis, G.B.; da Silva, D.D.; Guedes, A. S.; Elesbon, A. A. A. 2020. Use of multivariate statistical methods to analyze the monitoring of surface water quality in the Doce River basin, Minas Gerais, Brazil. Environ Sci Pollut Res, 27: 35303–35318. doi:10.1007/s11356-020-09783-0
- Freire, M. M.; Santos, V. G.; Ginuino, I. S. F.; Aras, A. R. L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras., 12(3): 347-354.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64: 97–112.
- Gaskell, P. N.; Brooks, A. C.; Maltby, L. 2007. Variation in the Bioaccumulation of a Sediment-Sorbed Hydrophobic Compound by Benthic Macroinvertebrates: Patterns and Mechanisms. Environ. Sci. & Tech., 41(5): 1783–1789. doi:10.1021/es061934b
- Giongo, A.; dos Anjos Borges, L. G.; Marconatto, L.; de Lara Palhano, P.; Serbent, M.P.; Moreira-Silva, E.; Siqueira, P. L.; Martinho, C. T.; Barili, R.; Paz, L. V.; Moser, L. I.; Veríssimo, C. M.; Ketzer, J. M. M.; Medina-Silva, R. 2020. Adaption of microbial communities to the hostile environment in the Doce River after the collapse of two iron ore tailing dams. Heliyon, 6(8): e04778. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04778
- Girardin, V.; Grung, M.; Meland, S. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bioaccumulation in dragonfly nymphs (Anisoptera), and determination of alkylated forms in sediment for an improved environmental assessment. Sci Rep 10: 10958. doi:10.1038/s41598-020-67355-1
- Girotto, L.; Espíndola, E.L.G.; Gebara, R.C.; Freitas, J. S. 2020. Acute and Chronic Effects on Tadpoles (Lithobates catesbeianus) Exposed to Mining Tailings from the Dam Rupture in Mariana, MG (Brazil). Water Air Soil Pollut., 231: 325. doi:10.1007/s11270-020-04691-y
- Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R.; Miranda, T. O.; Pereira, T. M.; Merçon, J.; Davel, V. C.; Barbosa, B. V.; Pereira, A. C. H.; Frossard, A.; Ramos, J. P. L. 2018. Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. Braz. Journ. of Biol., 79(4). doi:10.1590/1519-6984.188086
- Gomes, M. P.; Brito, J. C. M.; Viera, F.; Kitamura, F. S. A.; Juneau, P. 2022. Emerging Contaminants in Streams of Doce River Watershed, Minas Gerais, Brazil. Frontiers in Environmental Science. 9: 801599. doi: 10.3389/fenvs.2021.801599
- Guerra, M.B.B.; Teaney, B.T.; Mount, B.J.; Asunskis, D. J.; Jordan, B. T.; Barker, R. J.; Santos, E. E.; Schaefer, C. E. G. R. 2017. Post-catastrophe Analysis of the Fundão Tailings Dam Failure in the Doce River System, Southeast Brazil: Potentially Toxic Elements in Affected Soils. Water Air Soil Pollut., 228: 252. doi:10.1007/s11270-017-3430-5
- Ha, M.; Choi, J. 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvaeof aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarkerfor ecotoxicity monitoring. Chemosphere, 71:1928-1936.

- Hare, L.; Tessier, A.; Borgmann, U. 2003. Metal Sources for Freshwater Invertebrates: Pertinence for Risk Assessment. Human and Ecol. Risk Ass.: An Inter. Journal, 9(4): 779–793. doi: 10.1080/713610009
- Hayford, B. L.; Sublette, J. E.; Herrmann, S. J. 1995. Distribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) and ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae) along aColorado thermal spring effluent. Journ. of the Kansas Entom. Society (Special Publication 1), 68: 77–92.
- Hong, Y. S.; Kinney, K. A.; Reible, D. 2011. Effects of cyclic changes in pH and salinityon metals release from sediments. Environ. Toxicol. Chem., 30:1775–1784
- Johnson, R. K.; Wiederholm, T.; Rosenberg, D. M. 1993. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates (eds: M. Rosenberg & V. H. Resh), New York: Chapman & Hall. pp. 40-158
- Jørgensen, A.; Giessing, A. M. B.; Rasmussen, L. J.; & Andersen, O. 2008. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes. Marine Environ. Res., 65(2): 171–186. doi:10.1016/j.marenvres.2007.10.001
- Kiffney, P.M.; Clements, W. H. 1993. Bioaccumulation of heavy metals by benthic invertebrates at the Arkansas River, Colorado. Environ. Toxic. Chem., 12: 1507-1517.
- Koshima, S. 1984. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. Nature 310: 225–227.
- Krantzberg, G.; Stokes, P.M. 1990. Metal concentrations and tissues distribution in larvae of *Chironomus* with reference to x-ray microprobe analysis. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 84–93. doi: 10.1007/BF01059816
- Lam, P. K. S.; Gray, J.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmers. Marine Pollu. Bull., 46:182-186.
- Lapworth, D. J.; Baran, N.; Stuart, M. E.; Ward, R. S. 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. Environ. Pollut., 163:287–303. doi:10.1016/j.envpol.2011.12.034
- Lavarías, S., Arrighetti, F.; Siri, A. 2017. Histopathological effects of cypermethrin and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on midgut of *Chironomus calligraphus* larvae (Diptera: Chironomidae). Pest. Biochm. and Phys., 139:9-16.
- Lee, S.-M.; Lee, S.-B.; Park, C.-H.; Choi, J. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. Chemosphere, 65(6):1074–1081.
- Leonard, E. M.; Belowitz, R.; Agema, P.; O'Donnell, M. J. 2018. Characterization of Cadmium and Calcium Fluxes Along the Gut, Malpighian Tubules and Anal Papillae of the Dipteran, *Chironomus riparius*. Environ. Toxic. Chem., 37(10): 2542-2549. doi:10.1002/etc.4211

Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Annu. Rev. Physiol. 68: 253–278.

Linevich, A. A. 1971. The Chironomidae of Lake Baikal. Limnologica (Berlin) 8: 51–52

Livingstone, D. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp. Bioch. and Phys. Part A: Mol. & Integ. Phys.,120(1): 43–49. doi:10.1016/s1095-6433(98)10008-9

Lobato L.M.; Vieira F.W.R.; Ribeiro-Rodrigues L.C.; Pereira L.M.M.; Menezes M.G.; Junqueira P.A.; Pereira S.L.N. 1998. Styles of hydrothermal alteration and gold mineralization associated with the Nova Lima Group of the Quadrilátero Ferrífero, Part I. Description of selected gold deposits. Revis. Bras. Geoc., 28(3):339-354. doi: 10.25249/0375-7536.1998339354

Locke, M.; Nichol, H. 1992. Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. Ann. review of entom., 37(1): 195-215

Lunardelli, B.; Cabral, M. T.; Vieira, C. E. D.; Oliveira, L. F.; Risso, W. E.; Melettl, P. C.; Martinez, C. B. R. 2018. Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. Ecotoxicol. Environ. Saf, 153:188-194.

Macêdo, A. K. S.; dos Santos, K. P. E.; Brighenti, L. S.; Windmöller, C. C.; Barbosa, F. A. R.; de Azambuja Ribeiro, R. I. M.; dos Santos, H. B.; Thomé, R. G. 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings damin Mariana, MG, Brazil. Sci. Total Environ., 139505. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139505

Mackay, D. M.; Roberts, P. V.; Cherry, J. A. 1985. Transport of organic contaminants in groundwater. Environ. Science & Tech., 19(5): 384–392. doi:10.1021/es00135a001

Magalhães, D. P.; Ferrão Filho, A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, 12(3):355-381.

Marinković, M.; Verweij, R. A.; Nummerdor, G. A.; Jonker, M. J.; Kraak, M. H. S.; Admiraal, W. 2011. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. Environ. science & tech., 45(4):1645–51.

Martinez-Finley, E. J., Sudipta Chakraborty, S.; Fretham, S. J. B.; Aschner, M. 2012. Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals, Metallomics, 4(7):593–605, doi:10.1039/c2mt00185c

Martínez-Jerónimo F.; Cruz-Cisneros, J. L.; García-Hernández, L. 2008. A comparisonof the response of Simocephalus mixtus (Cladocera) and *Daphnia magna* to contaminated freshwater sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf., 71:26–31

- Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J. L.; Morcillo, G. 2013. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. Mutation Research/Genetic Tox. & Environ. Mutag., 758(1-2): 41–47. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.09.005
- Meis, M.R.M.; Tundisi, J.G. 1986. Geomorfological and limnological processes as a basis for typology. The midle Rio Doce lake system. An. Acad. Bras. Ciênc., 58(1):103-120.
- Mendes, L. B.; Mello, F. A.; Chagas, K. R.; Campelo, R. P. M.; Medeiros, L. C. C.; Smith, R. E. W.; Furley, T. H. 2020. Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the FundãO Dam Collapse. Int. Environ. Ass. & Manag.. 16(5): 608-614. doi:10.1002/jeam.4291
- Mendikute, G. A.; Cajaraville, M. P. 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicol. in Vitro 17:539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Teixeira, B. C.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V.L.; Agostinho, S. G. N.; Vasconcelos, C. M.; Gomes, L. C. 2022. Seasonality effects on the metal concentration and biochemical changes in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from Doce River after the collapse of the Fundão dam in Mariana, Brazil. Environ. Tox. & Pharm., 89: 103777
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Chisté Teixeira, B.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V. L.; Agostinho, S. G. N.; Gomes, L. C. 2021. Evidence of reproductive disturbance in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from the Doce River after the collapseof the Fundão Dam in Mariana, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res., 28:66643–66655.
- Mogren, C. L.; Webb, S. M.; Walton, W. E.; & Trumble, J. T. 2013. Micro x-ray absorption spectroscopic analysis of arsenic localization and biotransformation in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) and *Culex tarsalis* Coquillett (Culicidae). Environ. Pollu., 180:78–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.021
- Mompelat, S.; Le Bot, B.; & Thomas, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. Environ. Int.,35(5): 803–814. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008
- Morais, S. G.; Pesentl, E. C.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. A. 2014. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). Zoologia, 31(4):323–328.
- Moreau, X.; Saez, G.; Thiéry, A.; Clot-Faybesse, O.; Guiraudie-Capraz, G.; Bienboire-Frosini, C.; Martin, C.; De Jong, L. 2008. ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): A biomarker calibration step for in situ monitoring of xenobiotic exposure. Environ. Pollu., 153(3): 574–581. doi:10.1016/j.envpol.2007.09.019

- Mulholland, D.; Garnier, J.; Araújo, D.; Duarte, W. C.; Monvoisin.; Quantin, C.; Freydier, R.; Seyler, P. 2022. New insights into metal(loid) dynamics in the Doce Riverestuary (Brazil) after a massive iron ore-processing tailing dam collapse. Environ. Sci. Pollut. Res., 29:43072–43088. doi:10.1007/s11356-021-18101-1
- NRC (National Research Council). 2003. "Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments". In *Processes, Tools, and Applications*, Washington, DC, USA: National Academy Press.
- Nybom, I.; Abel, S.; Waissi, G.; Väänänen, K.; Mäenpää, K.; Leppänen, M.; Kukkonen, J. V. K.; Akkanen, J. 2016. Effects of Activated Carbon on PCB Bioaccumulation and Biological Responses of *Chironomus riparius* in Full Life Cycle Test. Environ. Sci. Technol. 50(10): 5252–5260
- OECD. 2011. Guidelines for the testing of chemicals. *Chironomus sp.*, Acute ImmobilisationTest. 235. pp.17.
- Oliver, D. R. 1971. Life History of the Chironomidae. Annu. Rev. of Entom., 16(1): 211–230. doi:10.1146/annurev.en.16.010171.001235
- Osmulski, P. A.; Leyko, W. 1986. Structure, function and physiological role of *Chironomus* haemoglobin. Comp. bioch. & phys., 85(4): 701-722.
- Pampanin, D. M.; Sydnes, M. O. 2013. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment. In Hydrocarbon (Eds.: V. Kutcherov, & A. Kolesnikov. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/48176
- Park, S. Y.; Choi, J. 2009. Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposurein Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83: 463–468. doi:10.1007/s00128-009-9745-1
- Passos, L. S.; Gnocchi, K. G.; Pereira, T. M.; Coppo, G. C.; Cabral, D. S.; Gomes, L. C. 2020. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? Sci. of The Tot.Environ., 736: 139644. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139644
- Petrović, M.; Eljarrat, E.; López de Alda, M. J.; & Barceló, D. 2001. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. TrAC Trends in Anal. Chem., 20(11): 637–648. doi:10.1016/s0165- 9936(01)00118-2
- Pillot, H. K. M. M. Chironomidae Larvae of the Netherlands and adjacent lowlands: biology and ecology of the Chironomini. KNNV Publishing, Zeist, 2009. pp. 270.
- Pinder, L. C. V. 1986. Biology of Freshwater Chironomidae. An. Rev. of Entom., 31(1): 1–23. doi:10.1146/annurev.en.31.010186.000245
- Pinho, L.C. 2008. Diptera. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: <a href="http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline">http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline</a>. 2008>

- Quaresma, V. S.; Catabriga, G.; Bourguignon, S. N.; Godinho, E. & Bastos, A. C. 2015. Modern sedimentary processes along the Doce river adjacent continental shelf. Braz. Journ. of Geol., 45(4): 635-644
- Rakotondravelo, M. L.; Anderson, T. D.; Charlton, R. E.; Zhu, K. Y. 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Arch. of Environ. Contam. and Toxic., 51(3):360–366.
- Ramos, R. L.; Lebron, Y. A. R.; Moreira, V. R.; Santos, L. V. S.; Amaral, M. C. S. 2021. Phenolic compounds in surface water: methodology and occurrence in Doce River, Brazil. Environ. Monit. Assess., 193: 687. doi:10.1007/s10661-021-09420-4
- Reboita, M.; Rodrigues, M.; Silva, L.; Alves, M. 2015. Aspectos climáticos do estado de Minas Gerais (climate aspects in Minas Gerais state). Rev. Bras. De Clima., 17. 10.5380/abclima.v17i0.41493.
- Rey, D.; Long, A.; Pautou, M.P.; Meyran, J.C. 1998. Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Entom. Experim. et App., 88:255–63.
- Rey, D.; Pautou, M.P.; Meyran, J.C. 1999. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. Journ. of Invert. Path., 73:173-181.
- Richardi, V. S.; Rebechi, D.; Aranha, J. M. R.; & Navarro-Silva, M. A. 2013. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. Zoologia, 30(2): 211–216. doi:10.1590/s1984-46702013000200011
- Richardi, V. S.; Vicentini, M.; Rebechi, D.; Fávaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2015. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). Rev. Bras. de Entom.. 59: 240-250.
- Rosen, M. R.; Van Metre, P. C. 2010. Assessment of multiple sources of anthropogenicand natural chemical inputs to a morphologically complex basin, Lake Mead, USA. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol 294:30–43
- Rosière C. A.; Chemale Jr. F. 2000. Itabiritos e minérios de ferro de alto teor do Quadrilátero Ferrífero Uma visão geral e discussão. *Geonomos*, 8(2):27-43. doi: 10.18285/geonomos.v8i2.155
- Rosière C. A; Spier C. A.; Rios F. J.; Suckau V. E. 2008. The itabirites of the Quadrilátero Ferrífero and related high-grade iron ore deposits: An overview. *In: Iron Formation-Related High-Grade Iron Ore* Banded. (Eds.: *Hagemann S., Rosière C.A., Gutzmer J., Beukes N.J.*). Soc. of Econ. Geo., Inc. Reviews in Economic Geology, 15:223-254.

- Saez, G.; De Jong, L.; Moreau, X.; Sarrazin, L.; Wafo, E.; Schembri, T.; Lagadec, V.; Diana, C.; Monod, J-L.; Thiéry, A. 2008. Evaluation of pollutant exposure by chemicaland biological markers in a Mediterranean French urban stream: A step for in situ calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. Environ. Res., 107(3): 351–361. doi:10.1016/j.envres.2008.01.003
- Santos, O. S. H.; Avellar, F. C.; Alves, M.; Trindade, R. C.; Menezes, M. B.; Ferreira, M. C.; França, G. S.; Cordeiro, J.; Sobreira, F. G.; Yoshida, I. M.; Moura, P. M.; Scotti, M. R. 2019. Understanding the environmental impact of a mine dam rupture in Brazil: Prospects for remediation. Jour. of Environ. Qual., 48: 439–449. https://doi.org/10.2134/Jeq2018.04.0168
- Seidman, L. A.; Bergtrom, G.; Gingrich, D. J.; Remsen, C. C. 1986. Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. Tissue and Cell, 18(3): 395–405. doi:10.1016/0040-8166(86)90059-5
- Silva, D. de C.; Bellato, C. R.; Marques Neto, J. de O.; Fontes, M. P. F. 2018. Trace elements in river waters and sediments before and after a mining dam breach (Bento Rodrigues, Brazil). Quim. Nova, 41(8): 857–866. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170252
- Song, W. Y.; Park, J.; Eisenach, C.; Maeshima, M.; Lee, Y.; Martinoia, E. 2014. ABC Transporters and Heavy Metals. In: Geisler, M. (eds) Plant ABC Transporters. Signaling and Communication in Plants, vol 22. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3- 319-06511-3\_1
- Toušová, Z.; Kuta, J.; Hynek, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Bláha, L.; Hilscherová, K. 2016. Metallothionein modulation in relation to cadmium bioaccumulation and age- dependent sensitivity of *Chironomus riparius* larvae. Environ. Sci. and Pollu. Res., 23(11): 10504–10513. doi:10.1007/s11356-016-6362-5
- Trivinho-Strixino, S. 2011. Larvas de Chironomidae. Guia de Identificação. São Carlos, Depto Hidrobiologia/Lab. Entomologia Aquática/UFScar, pp. 371.
- Trivinho-Strixino, S.; STRIXINO, G. 1982. Ciclo de vida de Chironomus sancticaroli Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). Rev. Bras. de Entom., 26(2):183-189.
- Vicentini, M.; Morais, G. S.; Rebecchi-Baggio, D. R.; Richardl, V. S.; Santos, G. S.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. 2017. Benzo (a) pyrene Exposure Causes Genotoxicand Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). Neot. Entom., 46:665-658.
- Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Lunardelli, B.; Oliveira, L. F.; Cabrera, L. C.; Risso, W. E.; Primel, E. G.; Melettl, P. C.; Fillmann, G.; Martinez, C. B. R. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. Sci. of the Tot. Environ., 542:44-56.

- Vieira, C. E. D.; Marques, J. A.; da Silva, N. G.; Bevitório, L. Z.; Zebral, Y. D.; Maraschi, A. C.; Costa, S. R.; Costa, P. G.; Damasceno, E. M.; Pirovani, J. C. M.; Vale-oliveira, M.; Souza, M. M.; Martins, C. M. G.; Bianchini, A.; Sandrini, J. Z. 2022. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. Sci. of the Tot. Environ., 832: 154878.
- Wallace, W. G.; Lee, B. G.; Luoma, S. N. 2003. The subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. The significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically-detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser., 249: 183–197.
- Warren, N.; Allan, I. J.; Carter, J. E.; House, W. A.; Parker, A. 2003. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review. Ap. Geoc., 18(2): 159–194. doi:10.1016/s0883-2927(02)00159-2
- Weber, R.E., Vinogradov, S.N. 2001. Non-vertebrate hemoglobins: function and molecular adaptation. Physiol. Rev. v. 81, pp. 569-628
- Weber, A. A.; Sales, C. F.; de Souza Faria, F.; Melo, R. M. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. Ecotox. and Environ. Saf., 190: 110165. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110165
- Yamamoto, F. Y.; Pauly, G. F. E.; Nascimento, L. S.; Fernandes, G. M.; Santos, M. P.; Figueira, R. C. L.; Cavalcante, R. M.; Grassi, M. T.; Abessa, D. M. S. 2023b. Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sourcesof contamination and a major environmental disaster. Jour. of Haz. Mat. Adv., 9: 100250. https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100250
- Yamamoto, F. Y.; Souza, A. T. C.; de Paula, V. C. S.; Beverari, I.; Garcia, J. R. E.; Padial, A. A.; Abessa, D. M. S. 2022a. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. Sci. os the Tot. Environ. 846: 157332.
- Zhang, L.; Yang, J.; Li, H.; You, J.; Chatterjee, N.; Zhang, X. 2019. Development of the transjicriptome for a sediment ecotoxicological model species, *Chironomus dilutus*. Chemosphere, 125541. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125541
- Zheng, X.; Cheng, W.; Ji, C.; Zhang, J.; Yin, M. 2020. "Detection of metal ions in biological systems: A review". Rev. in Analy. Chem., 39(1):231-246. doi:10.1515/revac-2020-0118
- Zorzal-Almeida, S.; Fernandes, V. de O. 2021. Ecological thresholds of periphytic communities and ecosystems integrity in lower Doce River basin. Sci. of The Tot.Environ., 796: 148965. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148965

# **CAPÍTULO I**

MULTIPLAS FONTES DE POLUENTES QUE ALCANÇAM A BACIA DO RIO DOCE E SEU IMPACTO NA BIOLOGIA DE DIPTERA (CHIRONOMIDAE)

BENTÔNICO

#### **RESUMO**

Os xenobióticos que alcançam os sedimentos tem o potencial para influenciar negativamente a diversidade de macroinvertebrados nos ecossistemas aquáticos, como os Chironomidae (Diptera). A bacia do Rio Doce inserida no sudeste do Brasil, recebe múltiplas fontes de poluição como as provenientes do extrativismo mineral, agricultura, atividades industriais e efluentes urbanos, além disso foi afetada gravemente pela ruptura da barragem do Fundão, que armazenava milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério de ferro. Diante da complexidade de misturas de contaminantes se torna necessário investigar as possíveis consequências da exposição subcrônica aos sedimentos de diferentes segmentos do Rio Doce, na biologia de larvas de Chironomus sancticaroli. Foram realizadas coletas de sedimentos em julho e agosto de 2019 em seis locais ao longo da bacia do Rio Doce: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV) e Aimorés (AIM). Imaturos de Chironomus sancticaroli foram expostos por um período de oito dias e após a exposição foram preparadas amostras para determinação de bioconcentração de metais inorgânicos nas larvas. Foram contabilizadas a sobrevivência das larvas e tamanho da cápsula cefálica. Nas análises exploratórias entre os elementos químicos e pontos da bacia do Rio Doce foram realizadas análises de componentes principais (PCA). A sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli* após exposição aos seis sedimentos coletados ao longo da bacia do Rio Doce, oscilou entre 49% a 78%, o valor mais elevado para o baixo Rio Doce e o menor no médio Rio Doce. O tempo de desenvolvimento das larvas foi reduzido quando expostas aos sedimentos, principalmente no alto Rio Doce onde foi observada a presença de adultos precocemente. Elevados níveis de concentração de metais relacionados a atividade de mineração como Cd, Fe e Mn foram encontrados nas larvas. Na análise de fator de bioconcentração, Cu e Zn apresentaram maior afinidade de concentração no interior dos organismos. Os sedimentos dos pontos do médio Rio Doce localizados próximos ao polo industrial e aos centros urbanos com complexa mistura de contaminantes inorgânicos e orgânicos ocasionaram os maiores níveis letais e alterações no desenvolvimento das larvas.

Palavras-chaves: Ecotoxicologia; Poluição; Sedimento.

#### **ABSTRACT**

The xenobiotics that reach the sediments have the potential to negatively influence the diversity of macroinvertebrates in aquatic ecosystems, such as Chironomidae (Diptera). The Doce River basin located in southeastern Brazil, receives multiple sources of pollution such as those from mineral extraction, agriculture, industrial activities and urban effluents, in addition to being seriously affected by the rupture of the Fundão dam, which stored millions of cubic meters of iron ore tailings. Given the complexity of xenobiotic mixtures, it is necessary to investigate the possible consequences of subchronic exposure to sediments from different segments of the Doce River basin, on the biology of Chironomus sancticaroli larvae. Sediment collections were carried out in July and August 2019 at six locations along the Doce River basin: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Nague (NAQ), Reference (REF), Governador Valadares (GOV) and Aimorés (AIM). Immatures of Chironomus sancticaroli were exposed for a period of eight days and after exposure samples were prepared to determine the bioconcentration of inorganic metals in the larvae. Larval survival and head capsule size were recorded. In the exploratory analyzes between the chemical elements and points of the Rio Doce basin, principal component analyzes (PCA) were carried out. Survival of C. sancticaroli larvae after exposure to the six sediments collected along the Doce River basin ranged from 49% to 78%, the highest value for the lower Rio Doce and the lowest in the middle Rio Doce. The development time of the larvae was reduced when exposed to sediments, mainly in the upper Doce River where the presence of precocious adults was observed. High levels of concentration of metals related to mining activities such as Cd, Fe and Mn were found in the larvae. In the bioconcentration factor analysis, Cu and Zn showed higher concentration affinity inside the organisms. The sediments from the points of the middle Rio Doce located close to the industrial pole and urban centers with a complex mixture of inorganic and organic contaminants caused the highest lethal levels and alterations in the development of the larvae.

Keywords: Ecotoxicology; Pollution; Sediment.

# 1 INTRODUÇÃO

Múltiplas fontes de poluição advindos principalmente da descarga de efluentes domésticos e industriais, escoamento superficial de ambientes urbanos, agrícolas e de mineração influenciam constantemente os ambientes naturais, como ambientes aquáticos. Esses contaminantes são carreados para a calha dos rios onde escoam superficialmente ou se depositam. Contudo, fatores ambientais ou antrópicos podem ocasionar a ressuspenssão e redistribuição destes compostos no sistema aquático.

A bacia do Rio Doce inserida no sudeste do Brasil representa um sistema que recebe diversas fontes de poluição como as provenientes do extrativismo mineral, agricultura, atividades industriais e efluentes urbanos (Consórcio ECOPLAN-LUME, 2010). Além disso, sofreu grandes impactos sócio-ambientais ocasionados pelo rompimento da barragem que armazenava aproximadamente 40 milhões de metros cúbicos de rejeitos da extração de minérios de ferro (Fernandes et al., 2016; Carvalho et al., 2018). Dentre os impactos, destaca-se a mortandade de animais e considerável perda da biodiversidade logo após o evento e a persistência dos contaminantes (Gomes et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Passos et al., 2020; Weber et al., 2020; Merçon et al., 2021; Merçon et al., 2022; De Almeida et al., 2023; Mourão et al., 2023; Yamamoto et al., 2023a).

Pesquisas registram que após o rompimento da barragem ao longo da bacia foram detectados altos níveis de diferentes metais e metaloides depositados no sedimento, solo do entorno ou coluna d'água do Rio Doce ou afluentes como alumínio, arsênio, bário, chumbo, cobalto, cobre, crômio, escândio, ferro, manganês, mercúrio, níquel, selênio, titânio, vanádio e zinco (Guerra et al. 2017; Dos Reis et al., 2020; Santos et al., 2019; Fraga et al. 2020; De Matos et al., 2022; Mulholland et al. 2022; Yamamoto et al, 2023b). Alguns dos quais excedendo os limites estabelecidos pelo CONAMA, como arsênio e mercúrio (Yamamoto et al., 2023b). Também há presença de contaminantes orgânicos como compostos fenólicos (Ramos et al., 2021), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e piretroides (Yamamoto et al., 2023b).

A poluição de sedimentos é um importante fator que altera e pode reduzir a diversidade composição de macroinvertebrados nos ecossistemas aquáticos (Bendell-Younget al., 2000; Pettigrove & Hoffmann, 2005). Isto ocorre em decorrência da presença de diferentes estressores que causam alterações em diferentes níveis de organização

biológica, como os processos transcricionais (Mantilla et al., 2018) ou fisiológicos (Silva et al., 2021), comprometendo a homeostase e a sobrevivência desses organismos aquáticos.

Dentre os macroinvertebrados bentônicos associados ao sedimento, a espécie Chironomus sancticaroli Strixino e Strixino, 1981 é comumente utilizada como modelo para o estudo da poluição aquática no Brasil. As vantagens da espécie estão na ampla distribuição na região neotropical, incluindo o Brasil, ocorrendo em ambientes dulciaquícolas nos estágios de ovo, larvas e de pupa e tendo adultos alados terrestres. As larvas apresentam quatro instares, diferenciados pelo tamanho da cápsula cefálica (Richardi et al., 2013). As larvas se alojam no sedimento, geralmente enterrados em tubos nos quais, por movimentos constantes do corpo, conseguem realizar as trocas gasosas pela cutícula e por um sistema traqueal fechado (Pinho, 2008). Além disso, com uma substância pegajosa produzida pelas glândulas salivares (Oliver, 1971) capturam partículas orgânicas para alimentação. Tendo, portanto, papel relevante na ciclagem de nutrientes. Uma vez que o estágio larval representa o mais longo período em relação ao tempo de vida, a composição do sedimento, temperatura e o suprimento de alimento neste ambiente podem afetar o tempo de desenvolvimento, quantidade de oviposições das fêmeas e o número de gerações (Strixino & Trivinho- Strixino, 1985; Trivinho-Strixino & Strixino, 1989; Richardi et al., 2013).

A composição química do sedimento ajuda a entender quais fontes de poluição impactam negativamente a bacia, além da influência desses compostos nos organismos expostos. Dentre os contaminantes inorgânicos, os metais biodisponíveis tendem a se acumular intracelularmente em forma de grânulos (Wallace et al., 2003; Cain et al., 2004), principalmente naqueles tecidos relacionados com altas taxas de trocas iônicas como sistema digestório e excretor (Seidman et al., 1986; Krantzberg & Stokes, 1990; Craig et al., 1998; Mogren et al., 2013). A maioria dos trabalhos com insetos mensura a acumulação levando em consideração o corpo todo (Goodyear & McNeill, 1998; Corbi et al., 2010; Mebane et al., 2020; Veseli et al., 2022) e há poucos estudos de bioacumulação intracelular nesses organismos (Cain et al., 2004; Xie et al., 2009). A bioconcentração por sua vez pode considerar a presença dos compostos no sistema, sem considerar a excreção (Barboza et al., 2018). Apesar de não ser possível garantir que todos os metais presentes estavam biodisponíveis e bioacumulados intracelularmente, é possível hipotetizar que a presença do composto dentro do organismo (ainda que extracelularmente) pode apresentar implicações na biologia do organismo.

Além das diversas alterações intracelulares, os contaminantes orgânicos e inorgânicos podem afetar diferentes aspectos da biologia dos chironomideos, como alterações no tempo de desenvolvimento, tamanho do corpo, emergência de adultos, razão sexual e quantidade de ovos (Servia et al., 2006; Langer-Jaesrich et al., 2009; Rodrigues et al., 2015a; Rodrigues et al., 2015b, Somparn et al., 2017; Tokhun et al., 2017; Park & Kwak 2020).

A sobrevivência do organismo bentônico e consequentemente da população, é desafiada quando o sistema aquático recebe grande carga e diversidade de resíduos e substâncias, gerando mistura complexa de elementos. Além da composição físico-química do estressor ou mistura deles, a concentração e o tempo de exposição são fatores importantes para que estes elementos influenciem o organismo. Ambientes com elevada complexidade de misturas de contaminantes tem o potencial de interferir em múltiplas respostas biológicas considerando uma maior possibilidade de vias afetadas e as interações aditivas ou sinérgicas entre os compostos. Apesar da importância, poucos trabalhos abordam infomações sobre o impacto de múltiplas fontes de poluição em *C. sancticaroli*, e até o momento não foram realizadas investigações com este organismo na bacia do Rio Doce. Diante deste cenário esta pesquisa busca compreender as possíveis consequências que o sedimento de diferentes segmentos da bacia do Rio Doce, afetados por diferentes fontes de poluição, tem sobre componentes da biologia de larvas de *Chironomus sancticaroli*.

#### 1.1 OBJETIVOS

# 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a bioconcentração de metais e os efeitos letais e subletais no desenvolvimento de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica ao sedimento de diferentes segmentos da bacia do Rio Doce, MG/ES.

# 1.1.2 Objetivos específicos

Averiguar a bioconcentração de metais biodisponíveis para as larvas de Chironomus sancticaroli expostas ao sedimento do Rio Doce, em bioensaio de toxicidade subcrônica.

Verificar a toxicidade dos contaminantes presentes nos sedimentos de diferentes localidades ao longo da bacia do Rio Doce em *Chironomus sancticaroli* através dos parâmetros de sobrevivência larval e tempo de desenvolvimento após exposição subcrônica.

Analisar alterações no estágio de desenvolvimento larval através da mensuração do tamanho das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao sedimento, em bioensaio de toxicidade subcrônica.

Integração dos dados através de análises multivariadas para estabelecerrelações entre níveis de contaminação dos sedimentos, bioconcentrações nas larvas e os diferentes segmentos da bacia do Rio Doce.

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

# 2.1 Bioconcentração

2.1.1 Preparo de amostras para determinação multielementar por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado individualmente (ICP OES)

Para a análise da bioconcentração de metais, foram utilizadas larvas após a exposição subcrônica (8 dias) ao sedimento da bacia do Rio Doce e controle. As amostras de tecido das larvas que estavam armazenadas em freezer -80 °C, foram separadas em lotes por ponto de coleta do sedimento e controles. As amostras então foram pesadas e, aproximadamente 0,19309 g (massa média de amostra pesada por ponto de coleta; n=30) de cada amostra foi colocada em béquer de 100 mL (previamente lavados em ácido nítrico 5% por 24 horas) adicionando em seguida 4 mL de HNO3 65% (v/v) (Merck, Alemanha). A mistura foi levemente homogeneizada de forma manual e levada para aquecimento em chapa à 70 °C. Cessado a liberação de bolhas, foi adicionado 1 mL de H2O2 35% (v/v), aguardou-se novamente o término da ebulição e adicionou-se mais uma alíquota de 1 mL de H2O2, totalizando 2 mL. Ao término da ebulição, a mistura foi retirada do aquecimento e deixada esfriar a temperatura ambiente.

A solução final foi transferida para tubo Falcon de 14 mL e completado o volume

com água deionizada. O frasco foi armazenado a 4 °C até a análise dos metais.

2.1.2 Análise das amostras por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado individualmente (ICP OES)

Para a presente pesquisa foram feitas analises de concentração dos elementos inorgânicos prata (Ag), bário (Ba), cálcio (Ca), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), lítio (Li), magnésio (Mg), manganês (Mn), sódio (Na), níquel (Ni), fósforo (P), chumbo (Pb), enxofre (S), selênio (Se) e zinco (Zn).

As análises foram realizadas em espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) iCAP 6500 com vista axial (*Thermo Scientific*). Para o transporte das soluções, capilares (Orange/White) 0,64 mm d.i, (*Meinhard Galss Products*, (USA)). Os parâmetros instrumentais são apresentados na Tabela I.

Tabela I – Valores dos parâmetros instrumentais ICP-OES para obtenção das curvas analíticas e quantificação da bioconcentração dos elementos inorgânicos nas larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição ao sedimento da bacia do Rio Doce.

Radiofrequência	40 MHz	
Potência de radiofrequência (RF)	1,15 kW	
Vazão do gás do plasma	12,0 L min <sup>-1</sup>	
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min <sup>-1</sup>	
Vazão do gás de arraste	0,7 L min <sup>-1</sup>	
Tempo de estabilização	20 s	
Replicatas	3	
Tocha	Quartzo, vista axial	
	Ag	328,068
	Ca	393,366
	Cd	226,502
	Co	228,616
	Cr	267,716
	Cu	324,754
	Fe	259,940
	K	766,490
	Li	670,784
Linhas analíticas (nm)	Mg	279,553
	Mn	257,610
	Na	589,592
	Ni	221,604
	P	214,914
	Pb	,
		220,353
	S 7	182,034
	Zn	213,856

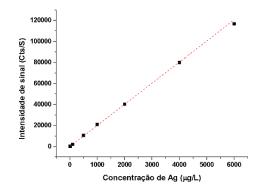
As curvas analíticas foram construídas a partir de solução padrão multielementar de 1000 mg/L marca *AccuStard*, (New Haven, USA) contendo Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd,

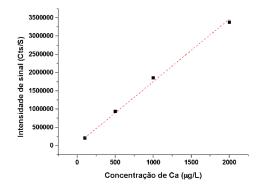
Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl e Zn, e soluções padrão monoelementares de 1000 mg/L marca *AccuStard*, (New Haven, USA) contendo S e P. A faixa de concentração da curva analítica foi entre 1,0 e 6000 mg/L em meio de HNO<sub>3</sub> 4% (v/v). Todas as curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,99 (Fig. 1).

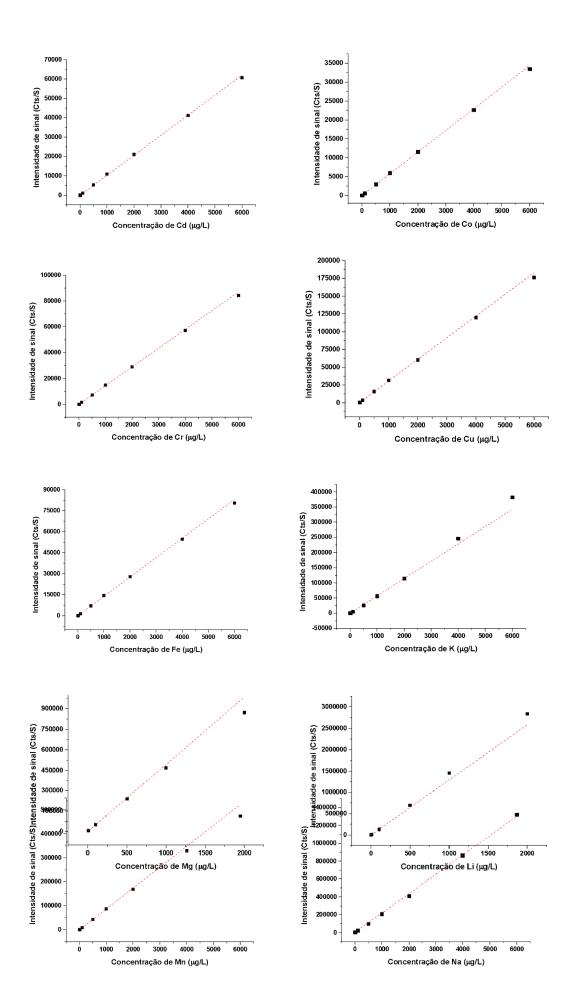
O limite de quantificação (LOQ) para os elementos analisados foi calculado segundo preconizado pela ANVISA, sendo o LOQ 10 vezes o desvio padrão das medidas do branco analítico ( $n \ge 7$ ) dividido pelo valor da inclinação da reta (coeficiente angular) para cada elemento. Para Cd, Cr, Cu, Fe, Li e Mn o LOQ foi de 1,0  $\mu$ g L <sup>-1</sup>, para Ag, Co, K, Mg, Na, Ni, P, Pb e Zn foi de 10  $\mu$ g L <sup>-1</sup> e para Ca e S 100 $\mu$ g L <sup>-1</sup>.

O limite superior na faixa da curva de calibração para o Ca e Li foi até 2000 μg/L, para os demais elementos, o limite superior da curva foi de 6000 μg/L. Todos os valores de concentração das amostras que estavam acima desses limites, foram realizadas novas leituras das amostras diluídas (100x) para o cálculo final (Controles: Ca, K, Na, P, S e Se; GUA: Fe, K e Na; Can: Fe e K; NAQ: Ca, Fe, K, Na, P, S e Se; REF: K, Na, P e S; GOV: Fe, K, Na, P e S; AIM: Fe, K, Na, P, S e Se).

Para obter a concentração final de cada elemento (mg/g de animal), primeiramente foi calculada a concentração do elemento no tubo falcon (concentração do elemento no ICP\*14mL/1000 mL), e depois calculada a concentração do elemento por massa de larvas (mg de elemento em 14 mL\*1g/massa de amostra de larvas no falcon). Para as amostras diluídas consideradas, a concentração do elemento no ICP foi multiplicada por 100x antes de efetuar o primeiro cálculo.







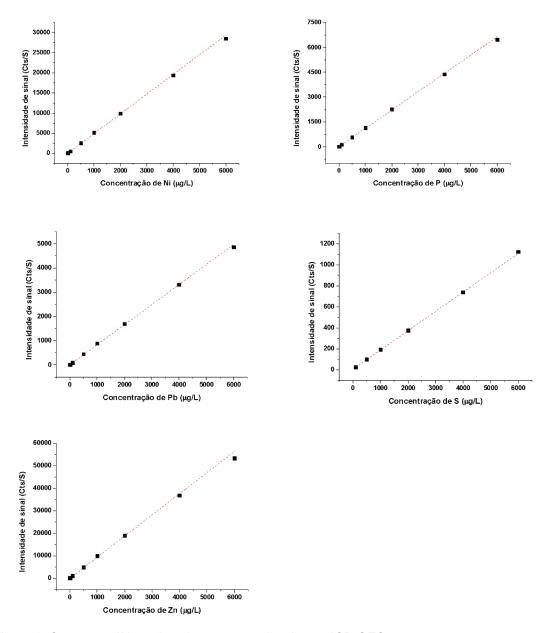


Figura 1. Curvas analíticas dos elementos analisados no ICP-OES

# 2.2 Parâmetros biológicos

# 2.2.1 Sobrevivência

Ao final do período de exposição aos sedimentos, foram contabilizadas as taxas de sobrevivência das réplicas de cada tratamento e seus respectivos controles (n inicial = 100 larvas em cada réplica de cada ponto e controles). A sobrevivência das larvas e pupas foi verificada pela ausência de atividade locomotora ao serem estimulados pela movimentação do sedimento e água ao entorno com uma pipeta. Os adultos que ficaram

aprisionados em tela (*voil* com elástico) mantida em cada um dos aquários, foram capturados por aspiração e contabilizados.

# 2.2.2 Tamanho da cápsula cefálica

O desenvolvimento das larvas foi avaliado em microscópio óptico mensurando o tamanho da cápsula cefálica, após a exposição subcrônica (8 dias) ao sedimento do Rio Doce. Foram avaliadas 20 cápsulas cefálicas por ponto de coleta e grupo controle, de larvas de quarto instar. Após os bioensaios, as larvas ainda vivas foram armazenadas em etanol 80% para preservação do organismo. Posteriormente, as cápsulas cefálicas foram fotografadas em vista ventral em microscópio estereoscópio com câmera acoplada em aumento de 100x. Foram tomadas as seguintes medidas: comprimento da região da base da cápsula até a ponta do dente trífido (Fig. 2), utilizando o programa *Axion vision* SE64. O comprimento também foi utilizado para determinar o instar dos organismos, seguindo as medidas estabelecidas por Strixino & Strixino (1985) (Richardi et al., 2013) para *C. sancticaroli*.

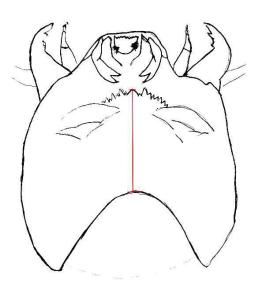


Figura 2. Imagem em vista ventral da cápsula cefálica com indicação dos marcos para obtenção das seguintes medidas: comprimento da região da base da cápsula até a ponta do dente trífido (linha vermelha) para medição do desenvolvimento das larvas de quarto instar.

#### 2.3 Análise dos dados

A concentração de cada elemento bioacumulado pelo organismo foi calculada segundo a fórmula:

$$[C] = \frac{valor\ da\ leitura*\ diluição*volume\ da\ solução}{massa}$$

Para indicar o grau de afinidade de um poluente a organismos vivos (Isnard & Lambert, 1988) foi feita a análise do Fator de bioconcentração (FBC), segundo a razão:

$$FBC = \frac{[c]_{organismo}}{[C]_{sedimento}}$$

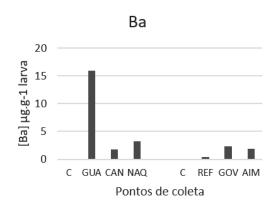
Para análise exploratória entre os elementos químicos (artigo de dados de Yamamoto et al., 2023b) e pontos da bacia do Rio Doce foram realizadas análises de componentes principais (PCA) para a variação espacial da bioconcentração em relação aos pontos da bacia do Rio Doce e a região da bacia em que o ponto está localizado (alto: Gualaxo do Norte (GUA) e Candonga (CAN); médio: Naque (NAQ), Referência (REF) e Governador Valadares (GOV) e baixo: Aimores (AIM), além dados químicos do sedimento (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), piretróides, metais, integração de todos os dados e matéria orgânica) em relação aos pontos da bacia do Rio Doce utilizando os pacotes Vegan, FactoMineR, Factoextra, Factoshiny e ggplot2, no software RStudio 4.2.1. Para determinar os eixos importantes das PCAs foi utilizado o Método de Broken Stick. Para análise de correlação dos elementos inorgânicos no sedimento e no organismo foram feitas análises de correlação de *Spearman* considerando o valor de R para determinar a correlação.

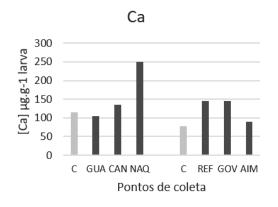
Para a análise dos parâmetros biológicos, os dados foram analisados previamente quanto à homocedasticidade (teste de Levene) e normalidade (teste de Shapiro-Wilk). Para dados normais (taxa de sobrevivência) foi realizado o teste de ANOVA  $\leq$  0,05 com *aposteriori* de Tukey. Para análise comparativa dos dados não paramétricos (tamanho das capsulas cefálicas) foi realizado o teste de Kruskal Wallis p  $\leq$  0,05, com *aposteriori* de Dunn's, uma vez que os dados não assumiram os pressupostos de normalidade.

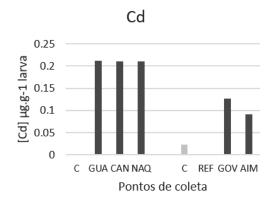
# 3 RESULTADOS

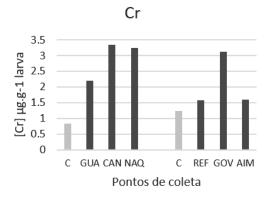
# 3.1 Bioconcentração

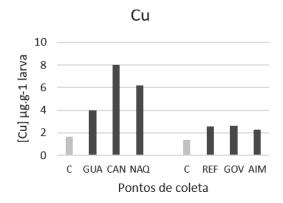
Os indivíduos expostos aos sedimentos de GUA foram os que apresentaram os níveis mais elevados de bário (Ba), ferro (Fe) e manganês (Mn). Os níveis de Ba (15,95 µg.g-1) e Mn (379,50 µg.g-1) detectados em GUA superaram mais de 15 e 132 vezes, respectivamente, os níveis detectados nos controles. Por outro lado, cromo (Cr) e cobre (Cu) estiveram presentes em maior concentração no ponto CAN (3,33 µg.g-1 e 8,02 µg.g-1 respectivamente) e chumbo (Pb) somente foi detectado nos indivíduos expostos ao sedimento de NAQ. Lítio (Li) foi detectado nos indivíduos expostos a todos os sedimentos exceto no ponto REF e nos controles. Enxofre (S) foi detectado em maior quantidade nos pontos do médio e baixo Rio Doce (Fig. 3).

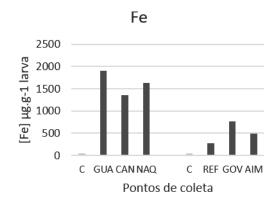


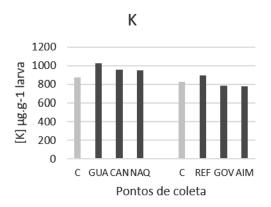


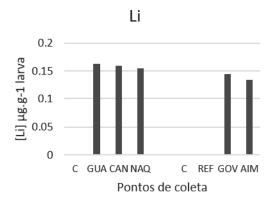


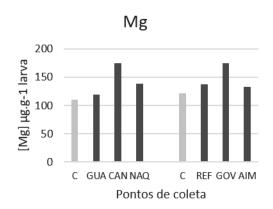


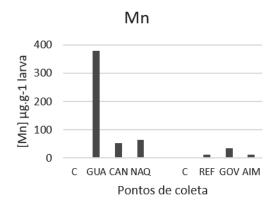


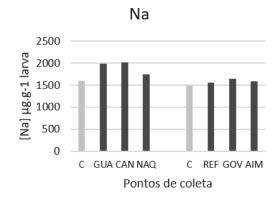


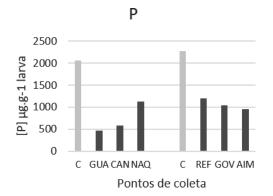












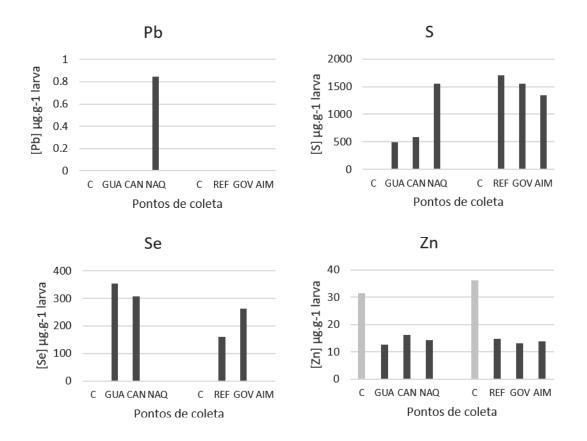


Figura 3. Concentração por grama de larvas dos elementos químicos inorgânicos dentro dos organismos.

Os únicos elementos que apresentaram maiores níveis nos controles em relação aos tratamentos foram o zinco (Zn) e fósforo (P).

Em relação à análise do fator de bioconcentração dos metais Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn nas larvas em razão dos mesmos elementos encontrados no sedimento, foi possível observar que os elementos Cu e Zn foram os que apresentaram maior fator de bioconcentração dentro dos organismos. O ponto AIM apresentou maior fator de bioconcentração para a maioria dos elementos. A presença de chumbo bioconcentrado ocorreu apenas nas larvas expostas ao sedimento do ponto NAQ (Tab. II).

Tabela II. Fator de bioconcentração (FBC) de metais pesados em larvas de *Chironomus sancticaroli*.

Pontos	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
GUA	0.0410	0.1346	0.2745	0.0066	0.0333	0.0000	0.3529
CAN	0.1608	0.1184	0.3485	0.0229	0.0419	0.0000	0.4232
NAQ	0.1351	0.0589	0.3883	0.0199	0.0511	0.0798	0.2839
REF	0.0000	0.0548	0.1474	0.0031	0.0128	0.0000	0.1729
GOV	0.0665	0.0476	0.1147	0.0100	0.0757	0.0000	0.1568
AIM	0.2443	0.0990	0.4348	0.0223	0.1070	0.0000	0.6678

(Dim1) para os elementos inorgânicos bioconcentrados em relação aos pontos de coleta dos sedimentos (Fig. 4 e 5), incluindo os controles, seguido por 19,8% da variação dos dados para o segundo componente. O primeiro componente aponta uma relação entre os scores mais negativos dos controles com os níveis de Zn e P, enquanto o ponto GUA apresentou maior relação com os níveis de Ba, K, Mn e Se, e por fim o ponto CAN indicou maior associação com Cu e Li. Os pontos do médio Rio Doce apresentaram maiores associações com S e Ca (Tabs. S1 e S2).

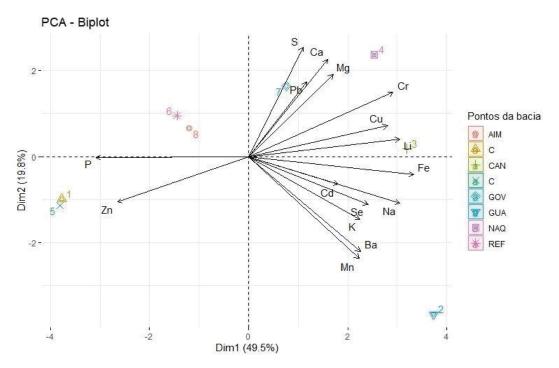


Figura 4. PCA dos dados da bioconcentração dos contaminantes inorgânicos detectados nas larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce, por ponto de coleta. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 2 = Gualaxo do Norte (GUA), 3 = UHE Candonga (CAN), 4 = Naque (NAQ), 6 = Referência (REF), 7 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 8 = Aimorés (AIM). 1 e 5 = Controles (C).

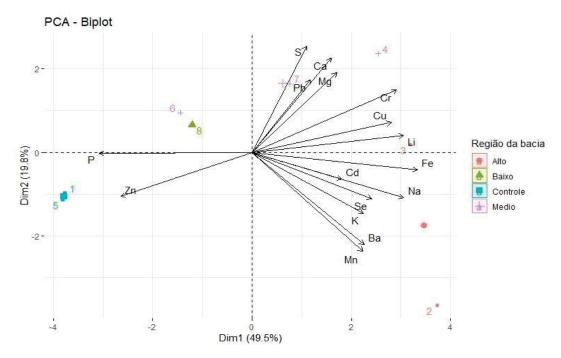


Figura 5. PCA dos dados da bioconcentração dos contaminantes inorgânicos detectados nas larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce, com amostras agrupadas por região da bacia hidrográfica do Rio Doce. Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 8 = Aimorés (AIM). 1 e 5 = Controles (C).

#### 3.2 Química do sedimento

## 3.2.1 Análises multivariadas

Os contaminantes inorgânicos foram explicados na PCA por 54,4% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1) e 24,9% no segundo componente principal (Dim2). O primeiro componente principal separou as variáveis em *loadings* negativos para os contaminantes químicos Mn, Fe, As, Hg e Cd relacionados ao ponto GUA, enquanto Cr, V, Sc, Ti, Al apresentaram *loadings* positivas e relação aos pontos REF e GOV (Fig. 6). O segundo componente principal apresentou apenas *loadings* positivos para as variáveis, permitindo discriminar os locais com maiores concentrações de contaminantes inorgânicos (GUA do alto Rio Doce, REF e GOV do médio Rio Doce) do que aqueles com menos contaminantes (baixo Rio Doce) (Tabs S3 e S4).

A PCA para os contaminantes orgânicos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) no sedimento explicou 66,0% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), seguido por 13,3% da variação dos dados para o segundo componente. Os locais do médio Rio Doce (NAQ e GOV) apresentaram os maiores níveis (Yamamoto

et al., 2023) da maioria dos contaminantes, exceto X2MNaf que se encontrou em maiores níveis em REF do médio Rio Doce, e X1MNaf e Naf nos pontos do alto Rio Doce (Fig. 7; Tabs.S5 e S6).

Para os contaminantes orgânicos piretróides (Permetrina, Ciflutrina, Cipermetrina, Deltametrina e Bifentrina) a PCA explicou 62,7% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1) e 16,6% no segundo componente principal (Dim2). Os pontos CAN e NAQ apresentaram maior nível de CYP e GOV apresentou todos os piretróides em sua amostra, sendo CYF e BIF em maior quantidade (Fig. 8;Tabs. S7 e S8).

Plotando todos os elementos e os valores de matéria orgânica, a PCA explicou 46,3% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1) e 22,6% no segundo componente principal (Dim2). É possível observar que os pontos do médio Rio Doce estiveram sobre influência da maior parte dos químicos orgânicos avaliados no sedimento, sendo também os pontos REF e GOV que apresentaram maiores valores de matéria orgânica (Fig. 9; Tabs. S9 e S10).

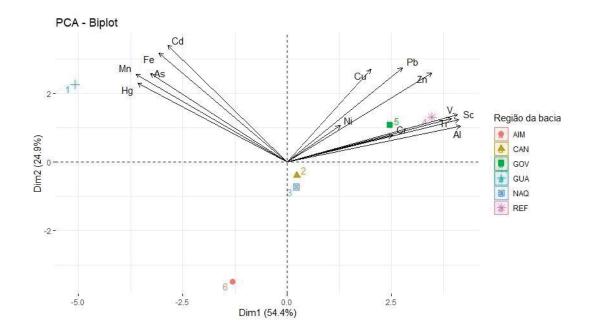


Figura 6. PCA dos metais e metalóides detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM).

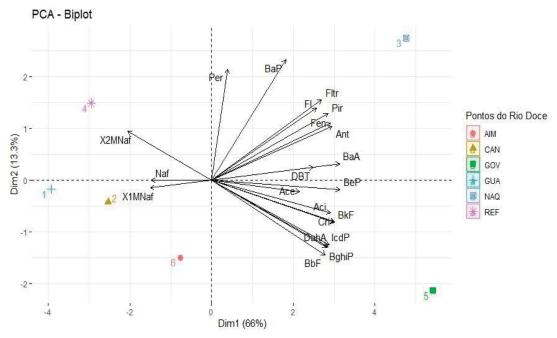


Figura 7. PCA dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais:1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM).

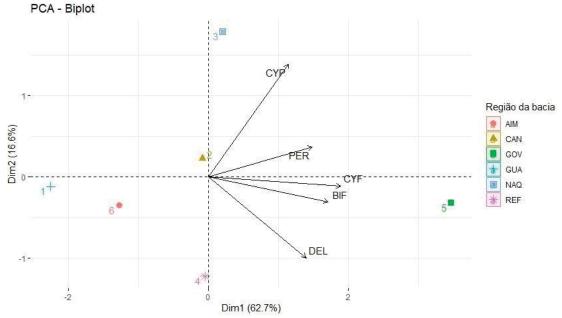


Figura 8. PCA dos piretroides detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM).

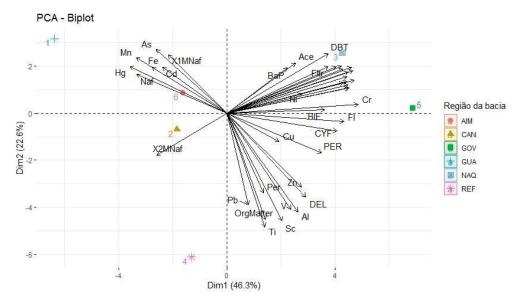


Figura 9. PCA de todos os elementos químicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, piretroides, metais e metaloides) e matéria orgânica detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM)

A maioria dos metais detectados nos sedimentos apresentaram correlação negativa com os metais bioconcentrados nas larvas (Fig. 10). Entre os mesmos metais, Cd e Mn apresentaram correlação positiva de presença no sedimento e bioconcentração.

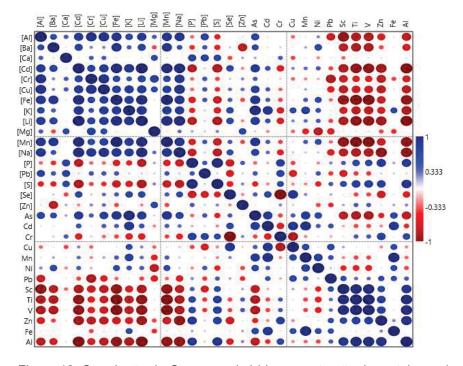


Figura 10. Correlação de *Spearman* (rs) bioconcentração de metais nas larvas, representados entre colchetes [], e a concentração de metais no sedimento,nomenclaturas sem colchetes

## 3.3 Parâmetros biológicos

# 3.3.1. Sobrevivência e estágio de desenvolvimento

Em relação à taxa de sobrevivência ao final do bioensaio, houve diferença significativa para os tratamentos. Em relação aos controles, não houve diferença significativa (p=1,0). Foi possível observar menor sobrevivência para os indivíduos dos pontos do médio Rio Doce, principalmente para o ponto REF (49%  $\pm$  16,16, p=0,009), seguido por NAQ (55%  $\pm$  16,80, p=0,039). Do alto Rio Doce, GUA teve menor taxa de sobrevivência (63%  $\pm$  14,73) do que CAN (65%  $\pm$  6,65), porém a diferença entre eles não foi significativa (Fig.11).

#### Sobrevivência por ponto da Bacia Hidrográfica

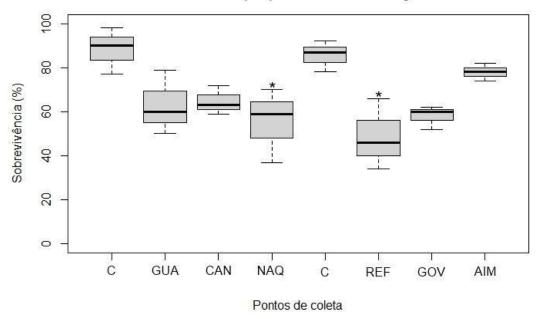


Figura 11. Sobrevivência de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica a seis sedimentos coletados ao longo da bacia do Rio Doce no período de 10/07/2019 a 20/08/2019. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Rio Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV). Ponto do baixo Rio Doce: Aimóres (AIM). \* = pontos que apresentaram diferença significativa no teste a posteriori de Tukey (p≤0,05).

Para a média percentual da sobrevivência por trecho do rio, observou-se sobrevivência de 87% dos organismos controles, enquanto nos segmentos, alto, médio e baixo do Rio Doce as taxas foram de 63,83%, 54,00% e 78,00% respectivamente (Fig. 12), sendo significativamente menores em relação ao controle para as regiões do médio (p=0,004) e alto (p=0,0004) Rio Doce.

## Sobrevivência por região da Bacia Hidrográfica

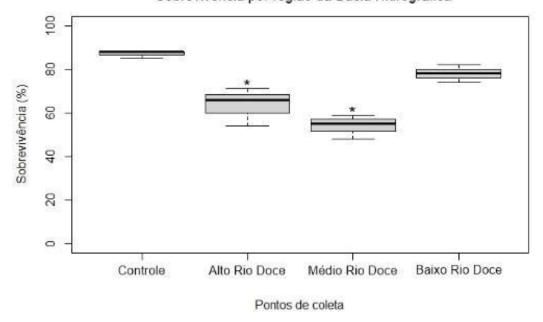


Figura 12. Sobrevivência de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica aos sedimentos coletados no alto, médio e baixo Rio Doce no inverno de 2019 e controles. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Rio Gualaxo do Norte e Reservatório de Candonga. Pontos do médio Rio Doce: Naque, Referência e Governador Valadares. Ponto do baixo Rio Doce: Aimóres. \* = pontos que apresentaram diferença significativa no teste a posteriori de Tukey (P<0,05).

Analisando o período de duração do estágio larval, observou-se precocemente a presença de estágios mais avançados (pupas e adultos) nas larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce, enquanto todos os organismos no grupo controle estavam no estágio larval ao final da exposição. Em todos os pontos e exposição aos sedimentos da bacia do Rio Doce os imaturos atingiram o estágio de pupa, entre 0,6% e 9,3%. Em apenas um ponto do alto Rio Doce (CAN) foi registrada a presença de adultos em percentual igual a 2,6% (Fig. 13).

Em relação às regiões da bacia do Rio Doce, em todas as larvas atingiram o estágio de pupa após a exposição aos sedimentos, sendo 2,6% dos indivíduos no alto Rio Doce, 6,78% dos indivíduos do médio, e 2,3% do baixo. A emergência em adultos ocorreu em 1,33% dos indivíduos do alto Rio Doce. No controle todos os indivíduos permaneceram em estágio de larva (Fig. 14).

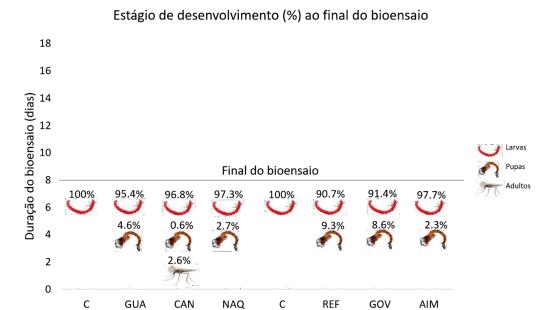


Figura 13. Porcentagem de estágio de desenvolvimento (larvas, pupas e adultos) ao final da exposição (oito dias) de *Chironomus sancticaroli* ao sedimento de diferentes pontos ao longo da bacia do Rio Doce. Controle (C). Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN). Naque (NAQ), Referência (REF). Governador Valadares (GOV). Aimorés (AIM).

Pontos de coleta

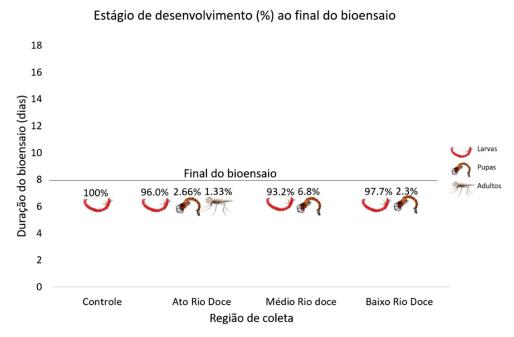


Figura 14. Porcentagem de estágio de desenvolvimento (larvas, pupas e adultos) ao final da exposição(oito dias) de *Chironomus sancticaroli* ao sedimento do alto, médio e baixo Rio Doce. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Pontos do médio Rio Doce: Naque, Referência e Governador Valadares. Ponto do baixo Rio Doce: Aimóres.

## 3.3.2. Tamanho da cápsula cefálica

Os valores mínimos e máximos da cápsula cefálica obtidos por pontos de coleta e grupos controles, após exposição subcrônica (oito dias) aos sedimentos estão dispostos na Tabela III. Todos os indivíduos analisados se encontravam no estágio de quarto instar. O ponto NAQ apresentou redução média significativa (Kruskal Wallis p ≤ 0,05, com *aposteriori* de Dunn's) no tamanho da cápsula cefálica em relação aos demais pontos, exceto com o ponto AIM (Fig. 15).

Tabela III. Valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de quarto instar de *C. sancticaroli* após exposição subcrônica (oito dias), aos sedimentos de seis localidades ao longo da bacia do Rio Doce. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV). Ponto do baixo Rio Doce: Aimorés (AIM).

Comprimento da cápsula cefálica (mm)						
Ponto de coletado	4° instar Máximo –					
sedimento	Mínimo					
С	0,322-0,272 a					
GUA	0,317-0,270 a					
CAN	0,315-0,263 a					
NAQ	0,313-0,267 b					
С	0,320-0,280 a					
REF	0,318-0,278 a					
GOV	0,322-0,281 a					
AIM	0,316-0,279 ab					

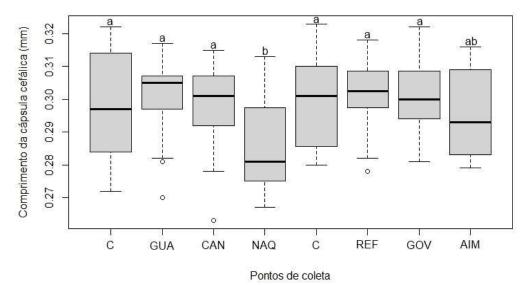


Figura 15. Média, valores mínimos e máximos do comprimento da cápsula cefálica (mm) de larvas de quarto instar de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica (oito dias), em substratos de seis localidades ao longo da bacia do Rio Doce. Controle (C). Pontos do alto Rio Doce: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN). Pontos do médio Rio Doce: Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV). Pontos do baixo Rio Doce: Aimóres (AIM). Letras diferentes indicam diferença significativa para o teste a posteriori de Dunn's (p≤0,05)

85

#### 3.3.3. Análises multivariadas

Plotando os compostos químicos analisados no sedimento e os parâmetros biológicos, a PCA explicou 44,04% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), 23,03% no segundo componente principal (Dim2) e 14.81% no terceiro componente principal. O primeiro componente principal apresentou loadings positivos para todos os contaminantes orgânicos, exceto X2MNaf, X1MNaf e Naf, permitindo discriminar os locais com maiores concentrações de contaminantes orgânicos no médio Rio Doce. Os loadings negativos agruparam As, Cd, Fe, Hg e Mn aos pontos do alto Rio Doce, maior sobrevivência e larvas em AIM e presença de adultos em CAN. O segundo componente principal apresentou relação entre os contaminantes Pb, Ti, Sc, Al, Zn, DEL, Per, matéria orgânica e estágio de pupa relacionados a REF e GOV (Fig. 16, Tabs. S11 e S12).

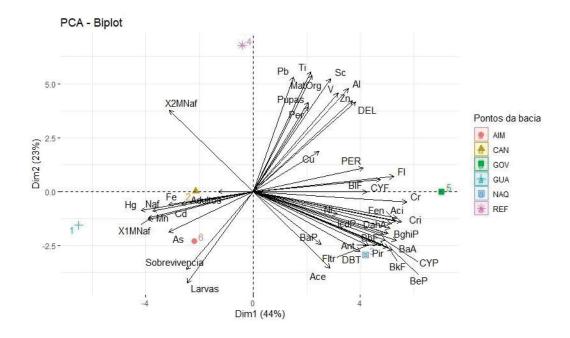


Figura 16. PCA de todos os elementos químicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, piretroides, metais e metaloides) e matéria orgânica detectados nos sedimentos da bacia do Rio Doce e os parâmetros biológicos (sobrevivência, larvas, pupas e adultos) em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos do alto Rio Doce: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN). Pontosdo médio Rio Doce: 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Pontodo baixo Rio Doce: 6 = Aimorés (AIM).

Plotando os metais bioconcentrados nas larvas e os parâmetros biológicos, a PCA explicou 40,13% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1) e

22,62% no segundo componente principal (Dim2). O primeiro componente principal apresentou loadings positivos para a maioria dos metais bioconcentrados, os pontos do alto Rio Doce (GUA e CAN) e o ponto NAQ no médio Rio Doce. O segundo componente principal apresentou relação entre os metais bioconcentrados Cu, Cd e presença de adultos para NAQ, e Ba, Se e Mn com presença de larvas em GUA (Fig.17; Tabs. S13 e S14).

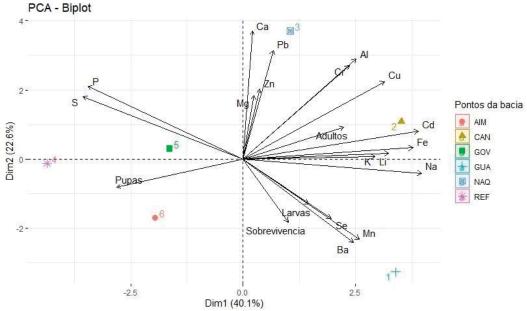


Figura 17. PCA de metais bioconcentrados nas larvas e os parâmetros biológicos (sobrevivência, larvas, pupas, adulto) em relação aos pontos de coleta dos sedimentos. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: 1 = Gualaxo do Norte (GUA), 2 = UHE Candonga (CAN), 3 = Naque (NAQ), 4 = Referência (REF), 5 = Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: 6 = Aimorés (AIM).

### 4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a exposição aos sedimentos contendo misturas complexas de contaminantes, relacionadas principalmente às regiões do alto e médio Rio Doce, afetaram significativamente o desenvolvimento e sobrevivência dos chironomídeos. Nestes segmentos da bacia as atividades econômicas incluem principalmente a mineração, a indústria, agricultura e presença de centros urbanos, as quais provavelmente estão relacionadas com os efeitos observados.

As análises multivariadas demonstraram a influência dos elementos inorgânicos no sedimento do alto Rio Doce, como Hg, Mn, As, Fe e Cd, e na bioconcentração dos metais Ba, Cd, Fe, Li, Cu e Mn nas larvas. Altos níveis de metais neste segmento do rio são corroborados por diversas pesquisas vinculados a fatores geológicos naturais e

antrópicos, como a intensa atividade de mineração na região e pelo rompimento da Barragem do fundão (Santolin et al., 2015; Carvalho et al., 2017; Guerra et al., 2017; Dos Reis et al., 2020; Ferreira et al., 2020; Macêdo et al., 2020; Weber et al., 2020). No médio Rio Doce, em GOV destacou-se apresença de Cr, Cd, Li, e S bioconcentradas dentro das larvas, assim como o ponto NAQ onde apresentaram os maiores níveis de concentração de Cd, Ca, Cr, Cu, Fe, Pb e S, provavelmente relacionados às atividades industriais e urbanas regionais, além da influência da mineração. Outros trabalhos relataram a presença de diferentes metais como Fe, Al, Mn, Cu, Cd, Pb e As (Quadra et al., 2018; Vasconcelos-Teixeira et al., 2021; Santos et al., 2022; Pauly et al., 2023) neste segmento do rio, e a interferência dos mesmos em diferentes organismos.

Níveis elevados de As, Fe e Mn no sedimento podem ser inicialmente atribuídos a sua presença natural em depósitos minerais característicos da região do quadriláfero ferrífero (Lobato et al., 2001; Borba et al., 2003). Estes níveis foram intensificados com a descarga de resíduos de atividade histórica de extração de minérios de ouro e ferro (Costa et al., 2003; Rodrigues et al., 2014; Cagnin et al., 2017). Similarmente, os níveis elevados de mercúrio são relacionados as atividades de extração de ouro (Cesar et al., 2011; Da Penha et al., 2018). Apesar da presença pré-desastre, o aumento do nível de enriquecimento de alguns elementos inorgânicos pode ser um indicativo da influência do rompimento da barragem do Fundão, onde o fluxo de rejeito de mineração causou remobilização e redeposição de sedimentos aluviais, trazendo e redistribuindo sedimentos e contaminantes (Htje et al., 2017; Duarte et al., 2020).

Nas larvas expostas aos sedimentos em todos os pontos da bacia do Rio Doce houve redução de bioconcentração do Zn e P em relação aos controles. Estudos indicam a ação protetiva de Zn, reduzindo a toxicidade quando em conjunto com outros elementos como Cu (Clements, 2004; Clements et al., 2013). Portanto, a redução da concentração do elemento, como observado na presente pesquisa, pode implicar em uma maior toxicidade por metais. Apesar disso, não é possível afirmar que a concentração desses metais detectadas no organismo todo reflita a absorção destes contaminantes. Isto se deve ao fato dos níveis de metais traços no conteúdo intestinal de animais, como os chironomídeos, poderem representar até mais da metade da quantidade total de metal contida em seu corpo, além da acumulação no exoesqueleto, o qual é eliminado pela muda ou excreção (Smock, 1983; Chapman, 1985; Gower & Darlington, 1990; Hare, 1992; Inza et al., 2001; Martin et al., 2008), não permitindo atribuir a concentração a bioacumulação. Além disso fatores como a biodisponibilidade dos

metais e a competição de íons metálicos livres para se ligar aos sítios bióticos ligantes, como enzimas de transporte de metais essenciais, influenciam na entrada desses elementos no organismo e a toxicidade (Amiard et al., 2006; Wang & Rainbow, 2013; Wang, 2013; Ardestani et al., 2015; De Paiva Magalhães et al., 2015).

Os sedimentos foram coletados durante o inverno (período seco), que representa um importante fator ambiental que influencia significativamente na distribuição e biodisponibilidade dos contaminantes da região. De acordo com Yamamoto et al., (2023b) os níveis dos contaminantes inorgânicos no sedimento em 2019 foram maiores no inverno devido a uma menor ressuspensão do sedimento durante o período da seca, onde a menor taxa de pluviosidade está relacionada à redução do fluxo do rio. Maiores níveis de metais nos sedimentos na estação seca em 2018 e 2019 também foram observados no estuário da mesma bacia por Maraschi et al. (2022). No baixo Rio Doce, Merçon et al. (2022) não observaram diferença na concentração de AI, Cr, Fe e Mn na água entre as estações nos anos de 2018 e 2019, mas Pb teve maior concentração na água na estação chuvosa. Influenciado pela mesma bacia, Rocha et al. (2022) também encontraram maiores níveis de metais (em tecidos de zooplâncton) na estação chuvosa. Entre os contaminantes orgânicos, Silva et al. (2018) encontraram maiores concentrações de demanda bioquímica de oxigênio na estação seca o qual relacionaram ao lançamento ocasional de esgoto altamente concentrado e sua menor diluição nos recursos hídricos.

Assim como o alto Rio Doce é influenciado por elevadas concentrações de metais e metaloides, no médio Rio Doce há maior quantidade de contaminantes orgânicos como HPAs e uma parte dos metais, principalmente nos pontos NAQ e GOV que recebem descargas de efluentes industriais e domésticos. Os HPAs são compostos químicos de maior hidrofobicidade que em geral têm uma alta afinidade com a matéria orgânica no sedimento (Honda & Suzuki, 2020), e capacidade de ultrapassarem barreiras biológicas lipofílicas como a membrana plasmática (Holmstrup et al., 2014). Invertebrados têm reduzida capacidade de metabolizar estas substâncias, e consequentemente tendem a apresentar concentrações relativamente mais altas de HPAs no corpo em comparação com os vertebrados (Thomann & Komlos, 1999; Ikenaka et al., 2008; Dwiyitno et al., 2016).

Apesar de diversas pesquisas relatarem a composição físico-química e contaminação na bacia do Rio Doce, principalmente relacionado a presença de metais, poucos trabalhos abordam a presença e respostas biológicas relacionados a contaminantes orgânicos (Lima et al., 2015; Ramos et al., 2021; De Souza et al., 2022;

Longhini et al., 2022; Yamamoto et al., 2022a, b, 2023a) e nenhum com respostas de exposição com insetos bentônicos (Tab. S15).

Larvas expostas aos sedimentos do alto e médio Rio Doce apresentaram mortalidade significativa, sendo as larvas expostas aos pontos do médio Rio Doce as que apresentaram maior mortalidade. Mortalidade em organismos expostos aos metais do alto Rio Doce, em exposição prolongada, foi observado também em girinos (Girotto et al., 2020). Contudo, para a maioria dos trabalhos, a exposição aguda aos contaminantes presentes na bacia do Rio Doce não ocasionou mortalidade significativa em peixes (Gomes et al., 2018; Passos et al., 2020; Yamamoto et al., 2022b).

A mortalidade significativa observada nesta investigação pode ser explicada pelo hábito alimentar detritívoro e bentônico dos chironomideos que estão em contato com os contaminantes depositados e concentrados no sedimento. Neste compartimento foi detectada elevada diversidade e concentração de compostos tóxicos inorgânicos e orgânicos nos pontos avaliados ao longo da bacia do Rio Doce. A ressuspensão das partículas do sedimento, por ação das larvas, pode influenciar na biodisponibilidade dos diferentes compostos químicos nos ambientes aquáticos. Além disso, o tempo de exposição na maioria das pesquisas realizadas com outros organismos que não apresentaram alteração na letalidade, enfatizam a importância de trabalhos de exposição subcrônicos e crônicos para detecção de efeitos (Gomes et al., 2018; Passos et al., 2020; Girotto et al., 2020; Yamamoto et al., 2022b).

Com relação aos estágios de desenvolvimento das larvas, é importante destacar o desenvolvimento de pupa observado nos organismos expostos aos sedimentos do Rio Doce, quando comparados aos controles. Segundo Richardi. et al. (2013), o desenvolvimento de pupa, em *C. sancticaroli* proveniente da mesma colônia matriz, ocorre a partir do 12 dia, tendo este estágio duração de dois dias. Portanto, comparativamente entre os dois trabalhos em condições experimentais similares, houve uma redução da duração do período larval de pelo menos 4 dias para aqueles que estavam em estágio de pupa e pelo menos 6 dias para os adultos. Não há relatos do adiantamento no processo de desenvolvimento em chironomideos expostos a contaminantes. Em exposição a metais, pesquisas relataram a redução do crescimento larval e atraso na emergência de adultos (Kranztberg & Stokes, 1989; Martinez et al., 2004; Servia et al., 2006; Muscatello & Liber, 2009; Park & Kwak, 2020).

Neste cenário levantamos duas hipóteses sobre o adiantamento do desenvolvimento: elevada disponibilidade de alimentação proporcionado pelo sedimento

ou estresse induzindo alteração hormonal. Para a primeira hipótese, a presença de matéria orgânica está associada aos sedimentos provenientes da bacia do Rio Doce (Yamamoto et al., 2023b), diferente do sedimento controle que não possuía fonte de nutrição extra. No ponto REF foi detectado elevado valor de matéria orgânica, seguido pelo ponto GOV, assim como os demais pontos, ainda que em menor quantidade. A presença da matéria orgânica pode ter influenciado no desenvolvimento precoce de pupas, já que recursos alimentares influenciam no tempo de desenvolvimento (Strixino & Trivinho-Strixino, 1985; Trivinho-Strixino & Strixino, 1989) e o estado nutricional desencadeia decisões metabólicas de crescimento e metamorfose (Johnson et al., 2014). Por outro lado, a redução do tempo também pode ter sido desencadeada por stress e alterações hormonais potencialmente relacionadas a exposição aos contaminantes, uma vez que os pontos de alto Rio Doce apresentam baixo teor de matéria orgânica e a emergênciade adultos.

Nos insetos, o corpo gorduroso detecta, coordena e integra múltiplos sinais hormonais e nutricionais, sendo, portanto, o órgão central para regular o desenvolvimento da pupa e a formação do adulto (Shingleton, 2005; King-Jones & Thummel, 2005). Este desenvolvimento e a metamorfose dos insetos são regulados por três grupos de sinais: (1) Ecd e JH; (2) insulina e AKH; (3) nutrientes e tensões.

Em insetos, a duração do crescimento é controlada principalmente pelo Ecd, a taxa de crescimento controlada pela insulina (Liu et al., 2009; Lorenz et al., 2009), as reações antiestresse oxidativas parecem ser reguladas predominantemente por hormônios adipocinéticos (AKHs), embora outros hormônios também estejam associados com esta resposta antioxidante (Kodrik et al., 2015). Dentre estes hormônios, o hormônio protoracicotrópico (PTTH) está envolvido em processos de adaptação ao estresse, regulando o desenvolvimento e as alterações morfofisiológicas e hormônios juvenis (JHs) envolvidos no controle de reações antioxidantes, e da regulação da síntese de proteínas biologicamente importantes (Kodrik et al., 2015) como vitelogeninas (Seehuus et al., 2006) e transferrina (Harizanova et al., 2005; Geiser & Winzerling, 2012). Essas reações antiestresse básicas são seguidas pela estimulação da resposta antiestresse fisiológica que envolve o aumento da ingestão de alimentos e processos digestivos no intestino do inseto (Zhang et al., 2014) e ativamente no controle da SOD, CAT e GST, da peroxidação lipídica nas membranas celulares (Bednářová, et al., 2013) e hemoglobinas (Nath, 2018) de insetos.

Exemplos de pesquisas demonstraram a ocorrência da desregulação endócrina

e alterações no corpo gorduroso desencadeadas por diferentes contaminantes químicos. Dhadialla et al. (1998) relataram a influência negativa de inseticidas no desenvolvimento e crescimento pela mimetização dos hormônios responsáveis por estes processos no organismo. Chang et al. (2022) observaram a ativação de diversos genes responsivos aos hormônios, crescimento e desenvolvimento na presença de inseticida regulador de crescimento Cyromazine. Herrero et al. (2018) observaram alterações na expressão gênica de diversos receptores hormonais na exposição do composto sintético Bisphenol S. Jiang et al. (2020) observaram alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e defesa antioxidante do corpo gorduroso do bicho-da-seda exposto a diferentes concentrações de selênio. Nanopartículas de dióxidos de titânio causaram alterações na expressão e atividade de enzimas responsivas ao estresse oxidativo no corpo gorduroso e enzimas relacionadas à digestão e absorção de nutrientes no intestino médio, além disso ocasionou o aumento do peso corporal (crescimento), na taxa de alimento ingerido e reduziu a taxa de sobrevivência (Zhang et al., 2014; Li et al., 2018). Alterações em cascatas de sinalização celular hormonal e/ou enzimas digestivas nas larvas expostas aos diferentes contaminantes presentes nos três segmentos da bacia do Rio Doce podem explicar a redução do tempo de desenvolvimento em relação as larvas controles.

Conforme apontado por vários estudos, grande espectro de contaminantes influenciam na composição química da bacia do Rio Doce, especialmente com elementos inorgânicos no alto Rio Doce, e múltiplas fontes inorgânicas e orgânicas no médio Rio Doce. Trabalhos biológicos com exposição a misturas complexas e com parâmetros reais do ambiente são de difícil operacionalização e compreensão quanto às interações e mecanismos que influenciam os organismos. Atrelado a isto pesquisas com organismos bentônicos como os chironomideos expostos a sedimentos são menos evidentes na literatura, principalmente com tempo de exposição elevado. Na presente pesquisa foi contatado que está complexidade gerou significativa mortalidade em larvas de *C. sancticaroli*, principalmente expostos aos sedimentos do médio Rio Doce, além de induzir o desenvolvimento precoce de pupas. Enfatizando o estresse gerado por este ambiente nestes organismos.

## 5 CONCLUSÃO

Conforme observado pelas análises multivariadas a composição química de todos os sedimentos é influenciada por metais, principalmente no alto Rio Doce próximo ao rompimento da barragem do Fundão. Além disso, produtos químicos orgânicos como HPAs e piretroides, introduzidos por outras atividades humanas parecem influenciar fortemente na composição química dos sedimentos do médio Rio Doce. A exposição de larvas de *C. sancticaroli* a estes sedimentos ocasionou a bioconcentração de diferentes metais no corpo da larva em todos os segmentos do rio, influenciada pelo hábito alimentar detritívoro. Além disso, todos os sedimentos provocaram alterações no tempo de desenvolvimento das larvas observados pela presença de pupas e em maior percentagem nas larvas expostas ao médio Rio Doce, além disso estes pontos influenciaram negativamente na sobrevivência das larvas, mesmo no ponto que não foi afetado pelo rompimento da barragem do Fundão (REF). Portanto, é possível que os pontos com maior presença de materia orgânica nos sedimentos podem estar biodisponibilizando maiores níveis de contaminantes presentes no sedimento, e que ao entraram em contato com estes organismos bentônicos causam toxicidade e danos letais e subletais.

#### **REFERENCIAS**

- Amiard, J. C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76: 160–202.
- Ardestani, M. M.; van Straalen, N. M.; van Gestel, C. A. M. 2015. Biotic ligand modeling approach: Synthesis of the effect of major cations on the toxicity of metals to soil and aquatic organisms. Environ. Toxic. and Chem., 34(10): 2194–2204. doi:10.1002/etc.3060
- Barboza, L. G. A.; Vieira, L. R.; Branco, V.; Carvalho, C.; Guilhermino, L. 2018. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. Sci. Rep., 8: 15655. doi:10.1038/s41598-018-34125-z
- Bednářová, A.; Krishnan, N.; Cheng, I.-C.; Večeřa, J.; Lee, H.-J.; Kodrík, D. 2013. Adipokinetic hormone counteracts oxidative stress elicited in insects by hydrogen peroxide: in vivo and in vitro study. Physiol. Entomol., 38: 54–62.
- Bendell-Young, L. I.; Bennett, K. E.; Crowe, A.; Kennedy, C. J.; Kermode, A. R.; Moore, M. M.; Plant, A. L.; Wood, A. 2000. Ecological characteristics of wetlands receiving an industrial effluent. Ecol. Appli., 10(1):310–322. doi:10.1890/1051-0761(2000)010[0310:ecowri]2.0.co;2
- Borba, R. P.; Figueiredo, B. R.; Rawlins, B.; Matschullat, J. 2002. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. Environ. Geo., 44(1): 39–52. doi:10.1007/s00254-002-0733-6
- Cain, D. J.; Luoma, S. N.; Wallace, W. G. 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. Environ. Toxic. and Chem., 23(6): 1463. doi:10.1897/03-291
- Cagnin, R. C.; Quaresma, V. S.; Chaillou, G.; Franco, T.; Bastos, A. C. 2017. Arsenic enrichment in sediment on the eastern continental shelf of Brazil. Sci. of The Tot.Environ., 607-608: 304–316. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.162
- Carvalho, M. S.; Moreira, R. M.; Ribeiro, K. D.; Alemida, A. M. 2017. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. Acta Bras. 1(3): 37-41
- Carvalho, G. O.; Pinheiro, A. D. A.; de Sousa, D. M.; Padilha, J. D. A.; Souza, J. S.; Galvao, P. M.; Paiva, T. D. C.; Freire, A. S.; Santelli, R. E.; Malm, O.; Torres, J. P. M. 2018. Metals and Arsenic in Water Supply for Riverine Communities Affected by the Largest Environmental Disaster in Brazil: The Dam Collapse on Doce River. Orb.: The Elec. Jour. of Chem., 10(4 SI):299-307. doi:10.17807/orbital.v10i4.1081
- Cesar, R.; Egler, S.; Polivanov, H.; Castilhos, Z.; Rodrigues, A. P. 2011. Mercury, copper and zinc contamination in soils and fluvial sediments from an abandoned goldmining area in southern Minas Gerais State, Brazil. Environ. Earth Sci., 64: 211–222. doi:10.1007/s12665-010-0840-8

Chang, Y. W; Wang, Y. C.; Yan, Y. Q.; Wu, C. D.; Xie, H. F.; Gong, W. R.; Du. Y. Z. 2022. Insect hormones affect the toxicity of the insecticidal groth regulator cyromazinein *Liriomyza trifolli* (Diptera: Agromyzidae). Pest. Bioc. and Phis., 188:105263

Chapman, P. M. 1985. Effects of gut sediment contents on measurements of metal levels in benthic invertebrates a Cautionary Note. Bulle. of Environ. Cont. and Toxic., 35(1): 345–347. doi:10.1007/bf01636520

Clements, W. H. 2004. Small-scale experiments support causal relationships between metal contamination and macroinvertebrate community responses. Ecol. Applic., 14(3): 954–967. doi:10.1890/03-5009

Clements, W. H.; Cadmus, P.; Brinkman, S. F. 2013. Responses of Aquatic Insects to Cu and Zn in Stream Microcosms: Understanding Differences Between Single SpeciesTests and Field Responses. Environ. Sci. & Tech., 47(13): 7506–7513. doi:10.1021/es401255h

Consorcio Ecoplan-Lume, 2010. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestãode recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce. Contrato Nº 043/2008 – IGAM, Vol. 1, 2010. pp. 472. Disponível em: <www.cbhdoce.org.br>

Corbi, J. J.; Froehlich, C. G.; Strixino, S. T.; & Santos, A. dos. 2010. Bioaccumulation of metals in aquatic insects of streams located in areas with sugar cane cultivation. Quím. Nova, 33(3): 644–648. doi:10.1590/s0100-40422010000300030

Costa, A.T.; Nalini, H.A.; de Lena, J.C.; Friese, K.; Mages, M. 2003. Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Braz. Env. Geo., 45: 226–235. doi:10.1007/s00254-003-0870-6

Craig, A.; Hare, L.; Charest, P. M.; Tessier, A. 1998. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). Aquatic Toxic., 41(3): 265–275. doi:10.1016/s0166-445x(97)00085-4

Da Penha Rhodes, V.; de Lena, J. C.; Santolin, C. V. A.; Pinto, T. S.; Mendes, L. A.; Windmoller, C. C. 2018. Speciation and quantification of Hg in sediments contaminated by artisanal gold mining in the Gualaxo do Norte River, Minas Gerais, SE, Brazil. Environ. Monit. Assess., 190: 49. doi:10.1007/s10661-017-6394-4

De Almeida, P. I. N.; De Jesus, H. E.; Pereira, P. H. F.; Vieira, C. E. D.; Bianchini, A.; Martins, C. M. G.; Dos Santos, H. F. 2023. The microbial profile of rivers and lagoons three years after the impact of the world's largest mining disaster (Fundão dam, Brazil). Environ. Res., 216(4): 114710

De Matos, A.R.; da Silva, H.T.; da Faria, M. C. S. et al. 2022. Environmental disaster in mining areas: routes of exposure to metals in the Doce River basin. Int. J. Environ. Sci. Technol. 19(12). doi:10.1007/s13762-022-03981-8

De Paiva Magalhães, D.; da Costa Marques, M. R.; Baptista, D. F.; Buss, D. F. 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. Environ. Chem. Lett., 13(1): 69–87. doi:10.1007/s10311-015-0491-9

- De Souza, A. C.; Cabral, A. C.; da Silva, J.; Neto, R. R.; Martins, C. C. 2022. Low levels of persistent organic pollutants in sediments of the Doce River mouth, South Atlantic, before the Fundão dam failure. Sci. of The Tot. Environ., 802: 149882. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149882
- Dhadialla, T. S.; Carlson, G. R.; Le, D. P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. of Entom., 43(1): 545–569. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.545
- Dos Reis, D.A.; Nascimento, L.P.; de Abreu, A.T.; Nalini Jr., A.; Roeser, H. M.; Santiago, A. F. 2020. Geochemical evaluation of bottom sediments affected by historicmining and the rupture of the Fundão dam, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res. 27: 4365–4375. doi:10.1007/s11356-019-07119-1
- Duarte, E. B.; Neves, M. A.; Benda de Oliveira, F.; Martins, M. E.; Rodrigues de Oliveira, C. H.; Burak, D. L.; Orlando, M. T. D.; Gabrig Turbay Range, C. V. 2020. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. Chemosphere, 127879. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127879
- Dwiyitno, Dsikowitzky, L.; Nordhaus, I.; Andarwulan, N.; Irianto, H. E.; Lioe, H. N.; Ariyani, F.; Kleinertz, S.; Schwarzbauer, J. 2016. Accumulation patterns of lipophilic organic contaminants in surface sediments and in economic important mussel and fishspecies from Jakarta Bay, Indonesia. Mar. Pollu. Bulle., 110(2): 767–777. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.034
- Fernandes, G. W.; Goulart, F. F.; Ranieri, B. D.; Coelho, M. S.; Dales, K.; Boesche, N.; Bustamante, M.; Carvalho, F. A.; Carvalho, D. C.; Dirzo, R.; Fernandes, S.; GalettiJr., P. M.; Millan, V. E. G.; Mielke, C.; Ramirez, J. L.; Neves, A.; Rogass, C.; Ribeiro, S. P.; Scariot, A.; Soares-Filho, B. 2016. Deep into the mud: ecological and socioeconomic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. Nat. & Cons., 14(2): 35–45. doi:10.1016/j.ncon.2016.10.003
- Ferreira, F. F.; Duca de Freitas, M. B.; Szinwelski, N.; Vicente, N.; Medeiros, L. C. C.; Reynaud Schaefer, C. E. G.; Dergam, J. A.; Sperber, C. F. 2020. Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. Integ. Environ. Asses. and Manag., 16(5): 622-630. doi:10.1002/ieam.4289
- Fraga, M. D.; Reis, G. B.; da Silva, D. D.; Guedes, H. A. S.; Elesbon, A. A. A. 2020. Use of multivariate statistical methods to analyze the monitoring of surface water quality in the Doce River basin, Minas Gerais, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res., 27: 35303–35318. doi:10.1007/s11356-020-09783-0
- Geiser, D. L.; Winzerling, J. J. 2012. Insect transferrins: Multifunctional proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects, 1820(3): 437–451. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.011

- Girotto, L.; Espíndola, E. L. G.; Gebara, R. C.; Freitas, J. S. 2020. Acute and Chronic Effects on Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) Exposed to Mining Tailings from the Dam Rupture in Mariana, MG (Brazil). Water Air Soil Pollut., 231:325. doi:10.1007/s11270-020-04691-y
- Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R.; Miranda, T. O.; Pereira, T. M.; Merçon, J.; Davel, V. C.; Barbosa, B. V.; Pereira, A. C. H.; Frossard, A.; Ramos, J. P. L. 2018. Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. Braz. Jour. of Biol., 79(4). doi:10.1590/1519-6984.188086
- Goodyear, K. L.; McNeill, S. 1998. Bioaccumulation of Heavy Metals by Freshwater Insect Larvae. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Rev. of Env. Contam. and Toxic. (Eds.: Ware, G.W.), vol 158. Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4612-1708-4 3
- Gower, A. M.; Darlington, S. T. 1990. Relationships between copper concentrations in larvae of *Plectrocnemia conspersa* (Curtis) (Trichoptera) and in mine drainage streams. Environ. Pollu., 65(2): 155–168. doi:10.1016/0269-7491(90)90181-b
- Guerra, M. B. B.; Teaney, B. T.; Mount, B. J.; Asunskis, D. J.; Jordan, B. T.; Barker, R.J.; Santos, E. E.; Schaefer, C. E. G. R. 2017. Post-catastrophe Analysis of the Fundão Tailings Dam Failure in the Doce River System, Southeast Brazil: Potentially Toxic Elements in Affected Soils. Water Air Soil Pollut., 228: 252. doi:10.1007/s11270-017-3430-5
- Hare, L. 1992. Aquatic Insects and Trace Metals: Bioavailability, Bioaccumulation, and toxicity. Crit. Rew. in Toxic., 22(5/6): 327-369.
- Harizanova, N.; Georgieva, T.; Dunkov, B. C.; Yoshiga, T.; Law, J. H. 2005. *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. Insect Mol. Biol.,14: 79–88.
- Hatje, V.; Pedreira, R. M. A.; de Rezende, C. E.; Schettini, C. A. F.; Souza, G. C.; Marin, D. C.; Hackspacher, P. C. 2017. The environmental impacts of one of the largesttailing dam failures worldwide. Sci. Rep., 7: 10706. doi:10.1038/s41598-017-11143-x
- Herrero, Ó.; Aquilino, M.; Sánchez-Argüello, P.; & Planelló, R. 2018. The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera Chironomidae). PLOS ONE, 13(2): e0193387.doi:10.1371/journal.pone.0193387
- Holmstrup, M.; Bouvrais, H.; Westh, P.; Wang, C.; Slotsbo, S.; Waagner, D.; Waagner, D.; Ipsen, J. H. 2014. Lipophilic Contaminants Influence Cold Tolerance of Invertebrates through Changes in Cell Membrane Fluidity. Environ. Sci. & Tech., 48(16): 9797–9803. doi:10.1021/es502221g
- Honda, M.; Suzuki, N. 2020. Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. Int. J. Environ. Res. Public Health, 17: 1363. doi:10.3390/ijerph17041363

- Ikenaka, Y.; Ito, Y.; Eun, H.; Watanabe, E.; Miyabara, Y. 2008. Characteristics of accumulation patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in the organisms inhabitedin Lake Suwa. J. Environ. Chem., 18: 341–352
- Inza, B.; Rouleau, C.; Tjälve, H.; Ribeyre, F.; Campbell, P. G. C.; Pelletier, É.; Boudou, A. 2001. Fine-Scale Tissue Distribution of Cadmium, Inorganic Mercury, and Methylmercury in Nymphs of the Burrowing Mayfly *Hexagenia rigida* Studied by Whole-Body Autoradiography. Environ. Res., 85(3): 265–271. doi:10.1006/enrs.2000.4228
- Isnard, P., & Lambert, S. (1988). Estimating bioconcentration factors from octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. Chemosphere, 17(1), 21–34. doi:10.1016/0045-6535(88)90040-9
- Jiang, L.; Peng, L. L.; Cao, Y. Y.; Thakur, K.; Hu, F.; Tang, S. M.; Wei, Z. J. 2020. Transcriptome analysis reveals gene expression changes of the fat body of silkworm (*Bombyx mori L.*) in response to selenium treatment. Chemosphere, 245: 125660. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125660
- Johnson, E. C.; Braco, J. T.; Whitmill, M. A. 2014. Connecting nutrient sensing and the endocrine control of metabolic allocation in insects. Cur. Op. in Ins. Sci., 1: 66–72. doi:10.1016/j.cois.2014.05.005
- King-Jones, K.; Thummel, C. S. 2005. Developmental biology. Less steroids make bigger flies. Science, 310:630–631.
- Kodrík, D.; Bednářová, A.; Zemanová, M.; Krishnan, N. 2015. Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects—An Update. Inter. J. of Mol. Sci., 16(10): 25788–25816. doi:10.3390/ijms161025788
- Kranztberg, G.; Stokes, P. M. 1989. Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46:389–398
- Langer-Jaesrich, M.; Köhler, H. R.; Gerhardt, A. 2009. Assessing Toxicity of the Insecticide Thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) Using Multiple End Points. Arch. of Environ. Cont. and Toxic., 58(4): 963–972. doi:10.1007/s00244-009-9420-x
- Li, J.; Xue, B.; Cheng, X.; Hu, J.; Hu, J.; Tian, J.; Li, F.; Yu, X.; Li, B. 2018. TiO2 NPs Alleviates High-Temperature Induced Oxidative Stress in Silkworms. J. of Econ. Entom., 111(2): 879–884. doi:10.1093/jee/toy002
- Lima, A. da C.; Heleno, F. F.; Afonso, R. J. de C. F.; Coutrim, M. X. 2015. Determination of PAHs in Surface Waters from the Doce and Piracicaba Rivers in Brazil. J. of Wat. Res. and Prot., 7(5): 422-429
- Liu, Y.; Liu, H.; Liu, S.; Wang, S.; Jiang, R. J.; Li, S. 2009. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. Arc. of Ins. Bioc. and Phys., 71(1): 16–30. doi:10.1002/arch.20290

- Lobato, L. M.; Ribeiro-Rodrigues, L.C.; Vieira, F. W. 2001. Brazil's premier gold province. Part II: geology and genesis of gold deposits in the Archean Rio das Velhasgreenstone belt, Quadrilátero Ferrífero. Min. Dep., 36: 249–277. doi:10.1007/s001260100180
- Longhini, C. M.; Rodrigues, S. K.; Costa, E. S.; da Silva, C. A.; Cagnin, R. C.; Gripp, M.; ... Sá, F. 2022. Environmental quality assessment in a marine coastal area impacted by mining tailing using a geochemical multi-index and physical approach. Sci. of The Tot. Environ., 803:149883. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149883
- Lorenz, M. W.; Gade, G. 2009. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. Int. and Comp. Biol., 49(4): 380–392. doi:10.1093/icb/icp019
- Macêdo, A. K. S.; dos Santos, K. P. E.; Brighenti, L. S.; Windmöller, C. C.; Barbosa, F. A. R.; de Azambuja Ribeiro, R. I. M.; Santos, H. B.; Thomé, R. G. 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. Sci. of The Tot. Environ., 139505. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139505
- Mantilla, J. G.; Gomes, L.; Cristancho, M. A. 2018. The differential expression of *Chironomus* spp genes as useful tools in the search for pollution biomarkers in freshwater ecosystems. Brief. in Func. Gen., 17(3): 151–156.doi:10.1093/bfgp/elx021
- Maraschi, A. C.; Marques, J. A.; Costa, S. R.; Vieira, C. E. D.; Geihs, M. A.; Costa, P.G.; Martins, C. M. G.; Sandrini, J. Z.; Bianchini, A.; Souza, M. M. 2022. Marine shrimps as biomonitors of the Fundão (Brazil) mine dam disaster: A multi-biomarker approach. Environ. Pollu., 305: 119245
- Martin, S.; Proulx, I.; & Hare, L. 2008. Explaining metal concentrations in sympatric *Chironomus* species. Limn. and Ocean., 53(2): 411–419. doi:10.4319/lo.2008.53.2.0411
- Martinez, E. A.; Moore, B. C.; Schaumloffel, J.; Dasgupta, N. 2004. Effects of exposureto a combination of zinc- and lead-spiked sediments on mouthpart development and growth in *Chironomus tentans*. Environ. Toxic. and Chem., 23(3): 662. doi:10.1897/02-512
- Mebane, C. A.; Schmidt, T. S.; Miller, J. L.; Balistrieri, L. S. 2020. Bioaccumulation And Toxicity Of Cadmium, Copper, Nickel, And Zinc And Their Mixtures To Aquatic Insect Communities. Environ. Toxic. and Chem.. 39(4): 812-833. doi:10.1002/etc.4663
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Teixeira, B. C.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V.L.; Agostinho, S. G. N.; Vasconcelos, C. M.; Gomes, L. C. 2022. Seasonality effects on the metal concentration and biochemical changes in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from Doce River after the collapse of the Fundão dam in Mariana, Brazil. Environ. Toxic. and Pharm.. 89: 103777
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Chisté Teixeira, B.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V. L.; Agostinho, S. G. N.; Gomes, L. C. 2021. Evidence of reproductive disturbance in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from the Doce River after the collapseof the Fundão Dam in Mariana, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res., 28: 66643–66655. doi:10.1007/s11356-021-15238-x

- Mogren, C. L.; Webb, S. M.; Walton, W. E.; Trumble, J. T. 2013. Micro x-ray absorption spectroscopic analysis of arsenic localization and biotransformation in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) and *Culex tarsalis* Coquillett (Culicidae). Environ. Pollu., 180: 78–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.021
- Mourão, A. O.; Santos, M. S.; da Costa, A. S. V.; Silva, H. T.; Maia, L. F. O.; Faria, M. C. S.; Rodriguez, M. V. R.; Rodrigues, J. L. 2023. Assessment of Health Risk and Presence of Metals in Water and Fish Samples from Doce River, Brazil, After Fundão Dam Collapse. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 84: 377–388. doi:10.1007/s00244-023-00991-6
- Mulholland, D.; Garnier, J.; Araújo, D.; Duarte, W. C.; Monvoisin, G.; Quantin, C.; Freydier, R.; Seyler, P. 2022. New insights into metal(loid) dynamics in the Doce River estuary (Brazil) after a massive iron ore-processing tailing dam collapse. Environ. Sci. Pollut. Res., 29: 43072–43088. doi:10.1007/s11356-021-18101-1
- Muscatello, J. R.; Liber, K. 2009. Accumulation and Chronic Toxicity of Uranium Over Different Life Stages of the Aquatic Invertebrate *Chironomus tentans*. Arch. of Environ. Contam. and Toxic., 57(3): 531–539. doi:10.1007/s00244-009-9283-1
- Nath, B. B. 2018. Extracellular hemoglobin and environmental stress tolerance in *Chironomus* larvae. Journal of Limnology. doi:10.4081/jlimnol.2018.1805
- Oliver, D. R. 1971. Life History of the Chironomidae. Annu. Rev. of Entom., 16(1): 211–230. doi:10.1146/annurev.en.16.010171.001235
- Park, K.; Kwak, I. S. 2020. Cadmium-induced developmental alteration and upregulation of serine-type endopeptidase transcripts in wild freshwater populations of *Chironomus plumosus*. Ecotox. and Environ. Safety, 192: 110240. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110240
- Passos, L. S.; Gnocchi, K. G.; Pereira, T. M.; Coppo, G. C.; Cabral, D. S.; Gomes, L. C. 2020. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? Sci. of The Tot. Environ., 736: 139644. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139644
- Pauly, G. F. E.; Cruz, A. C. F.; Treviani, T. H.; Kim, B. S. M.; Perina, F. C.; Yamamoto, F. Y.; Figueira, R. C. L.; Abessa, D. M. S. 2023. Spatial-temporal variations of metals and arsenic in sediments from the Doce River after the Fundão dam rupture and their bioaccumulation in Corbicula fluminea. Integ. Environ. Assess. and Manag., 1:12
- Pettigrove, V.; Hoffmann, A. 2005. A field-based microcosm method to assess the effects of polluted urban stream sediments on aquatic macroinvertebrates. Environ. Toxic. and Chem., 24(1): 170. doi:10.1897/03-459.1
- Pinho, L.C. 2008. Diptera. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline.

- Quadra, G. R.; Roland, F.; Barros, N.; Malm, O.; Lino, A. S.; Azevedo, G. M.; Thomaz, J. R.; Andrade-Vieira, L. F.; Praça-Fontes, M. M.; Almeida, R. M.; Mendonça, R. F.; Cardoso, S. J.; Guida, Y. S. Campos, J. M. S. 2018. Far-reaching cytogenotoxic effectsof mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.104
- Ramos, R. L.; Lebron, Y. A. R.; Moreira, V. R. Santos, L. V. S.; Amaral, M. C. S. 2021. Phenolic compounds in surface water: methodology and occurrence in Doce River, Brazil. Environ. Monit. Assess., 193: 687. doi:10.1007/s10661-021-09420-4
- Richardi, V. S.; Rebechi, D.; Aranha, J. M. R.; Navarro-Silva, M. A. 2013. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. Zoologia, 30(2): 211–216. doi:10.1590/s1984-46702013000200011
- Rocha, G. M.; Salvador, B.; Laino, P. S.; Santos, G. H. C.; Demoner, L. E.; Conceição, L. R.; Teixeira-Amaral, P.; Mill, G. N.; Ghisolfi, R. D.; Costa, E. S.; Longhini, C. M.; da Silva, C. A.; Cagnin, R. C.; Sá, F.; Neto, R. R. Junior, C. D. Oliveira, K. S.; et al. Fernandes, L. F. L. 2022. Responses of marine zooplankton indicators after five yearsof a dam rupture in the Doce River, Southeastern Brazil. Sci. of The Tot. Environ., 806: 151249.
- Rodrigues, A. C. M.; Gravato, C.; Quintaneiro, C.; Barata, C.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2015a. Sub-lethal toxicity of environmentally relevant concentrations of esfenvalerate to *Chironomus riparius*. Environ. Pollut., 207: 273–279. doi:10.1016/j.envpol.2015.09.035
- Rodrigues, A. C. M.; Gravato, C.; Quintaneiro, C.; Golovko, O.; Žlábek, V.; Barata, C.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2015b. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ., 508: 506–513. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.021
- Rodrigues, A. S. D. L.; Malafaia, G.; Costa, A. T.; Nalini Jr., H. A. 2014. Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte River basin, Minas Gerais State, Brazil. Environ. Earth Sci., 71: 4177–4186. doi:10.1007/s12665-013-2808-y
- Santolin, C. V. A.; Ciminelli, V. S. T.; Nascentes, C. C.; Windmoller, C. C. 2015. Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. Environ. Earth Sci., 74: 1235–1248. doi:10.1007/s12665-015-4115-2
- Santos, M. P. O.; Santos, M. V. N.; Matos, R. S.; Van Der Mass, A. S.; Faria, M. C. S.; Batista, B. L.; Rodrigues, J. L.; Bomfeti, C. A. 2022. Pleurotus strains with remediation potential to remove toxic metals from Doce River contaminated by Samarco dam mine. Int. J. Environ. Sci. Technol., 19: 6625–6638.doi:10.1007/s13762-021-03597-4
- Santos, O. S. H.; Avellar, F. C.; Alves, M.; Trindade, R. C.; Menezes, M. B.; Ferreira, M. C.; França, G. S.; Cordeiro, J.; Sobreira, F. G.; Yoshida, I. M.; Moura, P. M.; Scotti, M. R. 2019. Understanding the environmental impact of a mine dam rupture in Brazil: Prospects for remediation. J. of Environ. Quality, 48: 439–449. doi:10.2134/Jeq2018.04.0168

- Seehuus, S. C.; Norberg, K.; Gimsa, U.; Krekling, T.; Amdam, G.V. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:962–967.
- Seidman, L. A.; Bergtrom, G.; Gingrich, D. J.; Remsen, C. C. 1986. Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. Tiss. and Cell, 18(3): 395–405. doi:10.1016/0040-8166(86)90059-5
- Servia, M. J.; Péry, A. R. R.; Heydorff, M.; Garric, J.; Lagadic, L. 2006. Effects of copperon energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. Ecotoxicology, 15(3): 229–240. doi:10.1007/s10646-005-0054-0
- Shingleton, A. W. 2005. Body-size regulation: combining genetics and physiology. Curr. Biol., 15: R825–R827.
- Silva, D. de C.; Bellato, C. R.; Marques Neto, J. de O.; Fontes, M. P. F. 2018. Trace elements in river waters and sediments before and after a mining dam breach (Bento Rodrigues, Brazil). Quim. Nova, 41(8): 857–866. doi:10.21577/0100-4042.20170252.
- Silva, C. J. M.; Silva, P. A. L.; Campos, D.; Machado, A. L.; Pestana, J. L.; Gravato, C. 2021. Oxidative damage and decreased aerobic energy production due to ingestion of polyethylene microplastics by *Chironomus riparius* (Diptera) larvae J. Hazard. Mater, 402:123775. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123775
- Smock, L. A. 1983. Relationships between metal concentrations and organism size in aquatic insects. Fresh. Biol., 13(4): 313–321. doi:10.1111/j.1365- 2427.1983.tb00683.x
- Somparn, A.; Iwai, C. B.; Noller, B. N. 2017. Assessment of pesticide contaminated sediment using biological response of tropical chironomid, *Chironomus javanus* Kifferas biomarker. As. Pac. J. of Trop. Biomed., 7(8): 719–724. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.014
- Strixino, G.; Strixino, S. T. 1985. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras. Zool. [online]. 3(4):177-180. doi:10.1590/S0101-81751985000400003.
- Thomann, R. V.; Komlos, J. 1999. Model of biota-sediment accumulation factor for polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Toxic. and Chem., 18(5): 1060–1068. doi:10.1002/etc.5620180534
- Tokhun, N.; Iwai, C. B.; Noller, B. N. 2017. Metal Concentrations and Responses of Chironomid Larvae Exposed to Thailand Pulp and Paper Mill Effluent. Bull. of Environ. Contam. and Toxic., 99(5): 548–554. doi:10.1007/s00128-017-2166-7
- Trivinho-Strixino, S.; Strixino, G. 1989. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região Neotropical (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras.de Entom., 33 (2): 207-216.
- Vasconcelos-Teixeira, R.; Titon, S. C. M.; Titon-Jr, B.; Pompêo, M. L. M.; Gomes, F. R.; Assis, V. R. 2022. Stress Response, Immunity, and Organ Mass in Toads (*Rhinella diptycha*) Living in Metal-Contaminated Areas. Biol. Trace Element Res., 200: 800-811.

- Vaseli, M.; Rožman, M.; Vilenica, M.; Petrović, M.; Previšić, A. Bioaccumulation and bioamplification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in aquatic insects. Sci. of the Tot. Environ., 838(2): 156208. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156208.
- Wallace, W. G.; Lee, B. G.; Luoma, S. N. 2003. The subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. The significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically-detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser., 249: 183–197.
- Wang, W. X. 2013. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. Chin. Sci. Bull., 58:194–202
- Wang, W. X.; Rainbow, P. S. 2013. Subcellular Partitioning and the Prediction of Cadmium Toxicity to Aquatic Organisms. Environmental Chemistry, 3(6): 395. doi:10.1071/en06055
- Weber, A. A.; Sales, C. F.; de Souza Faria, F.; Melo, R. M. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. Ecotox. and Environ. Saf., 190: 110165. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110165
- Xie, L.; Flippin, J. L.; Deighton, N.; Funk, D. H.; Dickey, D. A.; Buchwalter, D. B. 2009. Mercury (II) Bioaccumulation and Antioxidant Physiology in Four Aquatic Insects. Environ. Sci. & Tech., 43(3): 934–940. doi:10.1021/es802323r
- Yamamoto, F. Y.; Pauly, G. E.; Nascimento, L. S.; Fernandes, G. M.; Santos, M. P.; Kim.; Carvalho, M. U.; Figueira, R. C. L.; Cavalcante, R. M.; Grassi, M. T.; Abessa, M. T. 2022a. Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River years after the mining dam collapse disaster. Data Brief, 45:108715. doi: 10.1016/j.dib.2022.108715.
- Yamamoto, F. Y., Souza, A. T. C., de Paula, V. C. S., Beverari, I., Garcia, J. R. E., Padial, A. A., Abessa, D. M. S. 2022b. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. Sci. os the tot. environ. 846: 157332.
- Yamamoto, F. Y.; Onishi, K.; Ralha, T. R.; Silva, L. F. O.; Deda, B.; Pessali, T. Y. C.; Souza, C.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Abessa, D. N. S. 2023a. Earlier biomarkers in fish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce River Basin. Environ. Pollu. 329: 121720. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121720
- Yamamoto, F. Y., Pauly, G. F. E., Nascimento, L. S., Fernandes, G. M., Santos, M. P., Figueira, R. C. L., Cavalcante, R. M., Grassi, M. T., Abessa, D. M. S. 2023b. Explainingthe persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sources of contamination and a major environmental disaster. J. of Haz. Mat. Adv., 9: 100250. doi:10.1016/j.hazadv.2023.100250
- Zhang, Ni, H. M.; Li, F.; Xu, K.; B Wng, B.; Hong, F.; Shen, W.; Li, B. 2014. Effects of feeding silkworm with nanoparticulate anatase TiO2 (TiO2 NPs) on its feed efficiency. Biol. Trace Elem. Res. 159: 224-232.

# CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM *Chironomus sancticaroli*STRIXINO & STRIXINO, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) EXPOSTOS AO
SEDIMENTO DA BACIA DO RIO DOCE

#### **RESUMO**

Eventos extremos, como o rompimento de barragem de acúmulo de rejeitos de mineração, podem despejar volume muito elevado de resíduos e quando nos corpos d'água, podem se depositar nos sedimentos e acumular nos organismos gerando impactos negativos para todo o ecossistema aquático. Entre os organismos bentônicos, os Chironomidae representam importante elo na teia alimentar dos ecossistemas dulcícolas. Diante da necessidade de compreender as possíveis relações entre as misturas de contaminantes em ambientes aquáticos com as respostas biológicas de um organismo bentônico, este estudo teve como objetivo avaliar as respostas dos perfis de atividade enzimática de α-Esterase, β-Eesterase, GST, SOD, CAT, AChE, danos na membrana por peroxidação lipídica (LPO), danos no DNA, expressão gênica de hemoglobinas e metalotioneína e consequências histopatológicas em larvas de Chironomus santicaroli expostas a diferentes sedimentos ao longo do Rio Doce, MG/ES, após o evento do rompimento da barragem de extração de minério de ferro (Fundão). Indivíduos imaturos de *Chironomus sancticaroli* foram expostos por um período de oito dias aos sedimentos coletados em seis locais ao longo da bacia do Rio Doce, durante julho e agosto de 2019: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referencia (REF), Governador Valadares (GOV) e Aimorés (AIM). Para cada grupo foram avaliadas 10 réplicas (pools de quatro larvas cada) para verificar respostas na atividade de enzimas de biotransformação, estresse oxidativo, danos em neurotoxicidade e expressão gênica de hemoglobinas e metalotioneína. Para cada grupo foram avaliadas 10 larvas para verificar alterações histológicas. Os resultados dos biomarcadores foram integrados por meio do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e relacionados com os contaminantes químicos encontrados no sedimento e bioconcentrados na larva através de análises de componentes principais (PCA). As principais modificações histológicas observadas ocorreram nas células do intestino médio com a presença de grânulos de sedimento no citoplasma das células, possivelmente associados a metais, que foram abundantes ao longo da bacia do Rio Doce. Os resultados indicam que os sedimentos dos pontos do médio Rio Doce foram os que mais afetaram os biomarcadores enzimáticos e onde ocorreu a maior frequência de alterações no sistema digestório e corpo gorduroso das larvas expostas. Estas respostas de alterações nas enzimas de biotransformação e estresse oxidativo foram associadas à presença de diversos metais tóxicos e contaminantes orgânicos provavelmente introduzidos pelos efluentes domésticos e industriais presentes neste segmento da bacia. No alto Rio Doce, as maiores expressões gênicas das hemoglobinas e metalotioneína possivelmente estão relacionadas com mecanismos antioxidantes e de biotransformação relacionados a presença de metais, predominantes neste segmento do rio. De acordo com os nossos dados, a interpretação das alterações subletais nos diferentes pontos ao longo da bacia do Rio Doce através do IBR em conjunto com as PCAs se mostraram eficazes, principalmente pela complexicidade de contaminantes presentes que impactam os diferentes segmentos da bacia. Além disso, a utilização de organismo bentônico permitiu avaliar a toxicidade do sedimento, compartimento impacto pelas atividades antrópicas de forma crônica na bacia do Rio Doce.

Palavras-chaves: Atividade enzimática; Biomarcadores; Sedimento; Xenobióticos.

#### **ABSTRACT**

Extreme events, such as the rupture of a dam that accumulates mining tailings, can dump a very high volume of waste and, when in water bodies, can be deposited in sediments and accumulate in organisms, generating negative impacts for the entire aquatic ecosystem. Among benthic organisms, the Chironomidae represent an important link in the food web of freshwater ecosystems. Faced with the need to understand the possible relationships between mixtures of contaminants in aquatic environments and the biological responses of a benthic organism, this study aimed to evaluate the responses of enzymatic activity profiles of α-Esterase, β-Esterase, GST, SOD, CAT, AChE, lipid peroxidation (LPO) membrane damage, DNA damage, hemoglobin and metallothionein gene expression and histopathological consequences in Chironomus santicaroli larvae exposed to different sediments along the Rio Doce, MG/ES, after the event the rupture of the iron ore extraction dam (Fundão). Immature individuals of C. sancticaroli were exposed for a period of eight days to sediments collected at six sites along the Doce River basin, during July and August 2019: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Reference (REF), Governador Valadares (GOV) and Aimorés (AIM). For each group, 10 replicates (pools of four larvae each) were evaluated to verify responses in the activity of biotransformation enzymes, oxidative stress, damage to biomolecules, neurotoxicity and gene expression of hemoglobins and metallothionein. For each group, 10 larvae were evaluated to verify histological alterations. Biomarker results were integrated using the Integrated Biomarker Response Index (IBR) and related to chemical contaminants found in the sediment and bioconcentrated in the larvae through principal component analysis (PCA). The main histological changes observed occurred in midgut cells with the presence of sediment granules in the cell cytoplasm, possibly associated with metals, which were abundant along the Rio Doce basin. The results indicate that the sediments from the middle Doce River were the ones that most affected the enzymatic biomarkers and where the highest frequency of changes in the digestive system and fat body of the exposed larvae occurred. These responses of changes in biotransformation enzymes and oxidative stress were associated with the presence of several toxic metals and organic contaminants probably introduced by domestic and industrial effluents present in this basin segment. In the upper Doce River, the higher gene expressions of metallothionein hemoglobins and are possibly related to antioxidant biotransformation mechanisms related to the presence of metals, predominant in this river segment. According to our data, the interpretation of sublethal changes at different points along the Rio Doce basin through the IBR in conjunction with the PCAs proved to be effective, mainly due to the complexity of the contaminants present that impact the different segments of the basin. In addition, the use of benthic organisms allowed assessing the toxicity of the sediment, a compartment impacted by human activities in a chronic way in the Rio Doce basin.

Keywords: Biomarkers; Enzyme activity; Sediments; Xenobiotics.

# 1 INTRODUÇÃO

Ambientes aquáticos são constantemente afetados por diversidade de contaminantes provenientes de atividades antrópicas. Esses contaminantes são carreados para a calha dos rios onde escoam superficialmente ou se depositam no sedimento. Um exemplo importante de ambiente aquático impactado por diferentes poluentes provenientes do extrativismo mineral, agricultura, atividades industriais e efluentes urbanas é a bacia hidrográfica do Rio Doce. Além disso, recebeu um grande volume de rejeitos da extração de minérios de ferro após o rompimento da barragemdo Fundão, comprometendo ainda mais a qualidade deste ambiente.

A bacia hidrográfica do Rio Doce é uma importante fonte hídrica do sudeste do Brasil, influenciada desde suas nascentes pela intensa extração de minérios e ao longo do seu curso são encontrados centros urbanos, industriais e agrícolas. Além disso, em 2015 recebeu em seu leito mais de 40 milhões de metros cúbicos de rejeitos da extração de minérios de ferro após o rompimento da barragem do Fundão (Consórcio ECOPLAN-LUME, 2010; Samarco, 2016), evento dramático sob qualquer ângulo de análise.

Dentre os compartimentos ambientais de um curso de água como o Rio Doce,o sedimento é um importante repositório para muitos dos produtos químicos mais persistentes introduzidos nas águas superficiais (Ingersoll, 1995). Além disso são sumidouro de uma grande variedade de produtos químicos. Os contaminantes podem ser particulados ou dissolvidos e não são necessariamente fixados permanentemente nos sedimentos (Eggleton & Thomas 2004). Mudanças nos parâmetros geoquímicos,como o pH, podem causar mobilização dos poluentes (Zoumis et al., 2001). Além disso, os processos de remobilização podem incluir a difusão de poluentes na massa de água (Dennis et al., 2009; Palumbo-Roe et al., 2012), devido a gradientes de concentração, oxidação de sedimentos anóxicos por bioturbação ou ressuspensão causada por chuvas e inundações (Crawford et al., 2022), atividades antrópicas como mineração e dragagem (Taylor & Owens, 2009) ou desastres ambientais como o rompimento de barragens (Duarte et al., 2020). Posteriormente, a exposição a um ambiente químico diferente pode resultar na transformação de contaminantes em formas químicas mais biodisponíveis ou tóxicas (Borch et al., 2010; Amde et al., 2017), sendo muitas vezes encontradas de forma vestigial na coluna d'água e acumuladas no sedimento (Chapman, 1989). A transferência direta de produtos químicos de sedimentos para organismos é então considerada

importante rota de exposição para muitas espécies, desencadeando a necessidade de testes de toxicidade de amostras desses sedimentos.

Os macroinvertebrados bentônicos estão intrinsicamente relacionados aos sedimentos dos ambientes aquáticos, e são comumente utilizados em estudos de determinação da qualidade desses ambientes (Fenoglio et al., 2002; Adakole & Anunne 2003; Azrina et al., 2006; Mugnai et al., 2011). Membros da família Chironomidae, como aqueles do gênero *Chironomus* são amplamente distribuídos nestes ambientes e suas larvas vivem no interior de tubos confeccionados com materiais do próprio sedimento.

Estes tubos estão geralmente dispostos nos primeiros centímetros do sedimento, e as larvas por movimentos constantes do corpo, conseguem realizar as trocas gasosas pela cutícula e por um sistema traqueal fechado (Pinho, 2008). Além disso, com uma substância pegajosa produzida pelas glândulas salivares (Oliver, 1971), ressuspendem e capturam partículas orgânicas para alimentação. Tendo portanto, papel relevante na ciclagem de nutrientes. Uma vez que o estágio larval representa o mais longo período em relação ao tempo de vida, a composição do sedimento influencia diretamente esses organismos, sendo portanto, bons organismos modelos para estudos ecotoxicológicos de sedimentos.

Para mensurar a toxicidade das substâncias, diferentes biomarcadores indicativos de efeitos podem ser avaliados como os bioquímicos, genéticos, histológicos.

Entre as respostas bioquímicas mais avaliadas para diferentes tipos de contaminantes ambientais, podem ser citadas as modulações nas atividades de várias enzimas antioxidantes e de biotransformação (Huggett et al., 1992), bem como os danos em biomoléculas, como a peroxidação lipídica e os danos genotóxicos (Olive, 1988).

Um dos principais mecanismos de defesa para detoxificação de compostos orgânicos é a biotransformação, na qual os compostos hidrofóbicos são convertidos em metabólitos mais hidrofílicos que são mais facilmente excretados, sendo este processo subdividido nas fases metabólicas I e II. As esterases consistem em enzimas que detoxificam por meio da catálise da hidrólise de ésteres ou sequestro de compostos, estando presentes na fase I da biotransformação (Rakotondravelo et al., 2006; Vicentini et al., 2017). As esterases em artrópodes podem ser classificadas em  $\alpha$  ou  $\beta$  esterases, dependendo de sua capacidade de hidrolisar os substratos  $\alpha$  e  $\beta$ - naftil acetato, respectivamente (Gigliolli et al., 2011; Dahan-Moss & Koekemoer, 2016). Em insetos, as diferentes esterases estão associadas a papéis fisiológicos relacionados ao

comportamento reprodutivo (Richmond et al., 1980; Chertemps et al., 2012), desenvolvimento (Briegel & Freyvogel, 1971; Browder et al., 2001) e resistência a inseticidas (Pasteur et al., 2001; Montella et al., 2012). Em Chironomidae pesquisas mostram alterações nas esterases pela exposição a compostos orgânicos como organofosforados (Turcherro et al., 1981; Rakotondravelo et al., 2006; Rebechi et al., 2014), organobromados (Palacio-Cortés et al., 2017) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Vicentini et al., 2017; Richard et al., 2018).

Nos organismos, as Glutationa-S-transferases (GSTs) estão envolvidas na fase II da biotransformação de contaminantes orgânicos (Printes et al., 2007; Planelló et al., 2015), catalisando a conjugação do tripetídeo glutationa com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, com o objetivo de torná-los menos tóxicos e predispostos para modificação posterior e excreção pela célula (Chelvanayagam et al., 2001; Printes et al., 2007; Allocati et al., 2018). Também estão envolvidos no transporte de xenobióticos através do citoplasma para serem novamente metabolizados através de enzimas de fase I, fundamental para biotransformação intracelular (Chelvanayagam et al., 2001; Printes et al., 2007). Além disso, são capazes de formar ligações covalentes com compostos eletrofílicos produzidos por enzimas de fase I, evitando a ligação das espécies ativadas ao DNA e outras macromoléculas celulares (Stegemanet al., 1992; Printes et al., 2007). A redução na atividade enzimática da GST pode afetar a capacidade de neutralizar os efeitos dos peróxidos lipídicos (Mela et al., 2014), podendo ocasionar o acúmulo de metabólitos da fase I, e o desiquilíbrio do estado redox celular (Liu et al., 2014).

Apesar da maioria dos estudos com esterases (ESTs) e GST estarem relacionados com a toxicidade induzida por compostos orgânicos, algumas pesquisas indicaram alterações após a exposição a metais (Somparn et al., 2015; Xu et al. 2015; Özaslanet al 2017; Morais et al. 2019).

Dentre os efeitos tóxicos de diversos poluentes estão os danos por estresse oxidativo, gerados por espécies reativas de oxigênio (EROS) formadas durante o metabolismo (Mendikute & Cajaraville, 2003) e potencializadas com a presença de metais através da reação de Fenton e Haber-Weiss. Os radicais hidroxila, embora de curta duração, são altamente reativos, oxidando os lipídeos da membrana e desnaturando proteínas e ácidos nucléicos (Lesser, 2006). Dentre as principais enzimas antioxidantes cruciais para neutralizar os ROS potencialmente prejudiciais estão as superóxidos dismutases (SODs) e catalase (CAT). As SODs são metaloenzimas, que catalisam a dismutação dos radicais superóxido (O2\*) em peróxido de hidrogênio (H2O2)

e oxigênio (O<sub>2</sub>) (Choi et al., 1999; Park et al., 2012), enquanto a catalase (CAT) converte o peróxido de hidrogênio em oxigênioe água (H<sub>2</sub>O) (Lopez-Martinez et al., 2008).

O aumento da atividade da SOD pode ser uma resposta às EROS geradas, atuando na conversão do O2\*- em peróxido que que são altamente reativos (Kim & Lee, 1997). Por outro lado, a baixa atividade da SOD pode resultar no acúmulo do radical superóxido que, por sua vez, pode inibir a CAT (Vicentini et al., 2017), gerando toxicidade (Park et al., 2012).

Quando as barreiras antioxidantes não são suficientes, ocorrem os danos celulares, que podem ser quantificados por análises bioquímicas de danos a membrana celular através da análise de peroxidação lipídica (LPO) e também por análises de danos ao DNA.

Outro mecanismo importante na avaliação de toxicidade é a mensuração de efeitos neurotóxicos através das enzimas colinérgicas como a acetilcolinesterase (AChE). Estas enzimas são importantes para o funcionamento adequado do sistema nervoso, sendo responsáveis pela hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica durante a transmissão do impulso nervoso. Contudo podem ser facilmente inibidas por pesticidas organofosforados e carbamatos, os quais podem apresentar afinidade pelo sítio ativo, se ligando de forma reversível ou irreversível (Printes et al., 2007; Vicentiniet al., 2017). Também existem evidências para o efeito dos metais na indução da atividade de AchE, a exemplo do observado por Morais et al. (2019) em larvas de *C. sancticaroli* expostas ao cádmio.

A expressão gênica é outro parâmetro comumente alterado em resposta à exposição a agentes tóxicos, como um resultado direto ou indireto da exposição aos xenobióticos (Lee et al., 2006). Esses biomarcadores moleculares podem ser quantificados quanto à expressão de determinados genes induzidos ou inibidos pela interação com poluentes.

Uma familía de genes de grande interesse para *Chironomus* são as hemoglobinas (Hbs) expressas durante a fase larval. As hemoglobinas são sintetizadas no corpo gorduroso, armazenas pelos oenócitos e secretada na hemolinfa das larvas, onde diferentes Hbs podem chegar a representar 80% das proteínas dissolvidas presentes (Bergtrom et al., 1976; Osmulski & Leyko, 1986; Saffarini et al., 1991). Essas hemoglobinas apresentam alto grau de polimorfismo, alta afinidade por oxigênio, estando relacionadas com papéis fisiológicos de transporte e armazenamento de oxigênio, circulando livremente pela hemolinfa (Nath, 2018) das larvas que se enterram no

substrato, muitas vezes contaminado e hipóxico (Osmulski & Leyko, 1986).

Alguns estudos têm demonstrado que as hemoglobinas dos quironomídeos podem ser indicadores de toxicidade de metais e hipóxia (Choi & Roche, 2004; Choi & Ha, 2009; Grazioli et al., 2016). Além disso, possivelmente estão envolvidas no metabolismo dos xenobióticos (Ha & Choi, 2008), pois o suplemento de oxigênio pode ajudar na rápida remoção de componentes tóxicos pela aceleração de reações metabólicas (Osmulski & Leyko, 1986). Portanto compreender as diferenças na expressão gênica em diferentes tipos de hemoglobinas expostas a contaminantes pode ajudar a entender a fisiologia desses organismos.

A expressão gênica da metalotioneína (MT) representa outro biomarcador amplamente utilizado e de relevância para a exposição a metais em organismos aquáticos, inclusive em *Chironomus* (Park & Kwak, 2012; Somparn et al., 2015; Arambourou et al., 2019). A metalotioneína é uma superfamília de proteínas ricas em cisteína com alta afinidade por metais, que contribuem para o armazenamento, transporte, metabolismo e detoxificação destes compostos através de defesa oxidativa e imunológica (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Wang et al., 2009; Choi et al., 2008; Somparn et al., 2015). Regulando também a homeostase de metais traço essenciais e participando na neutralização dos efeitos tóxicos de metais pesados (Viarengo et al., 1999; Park & Kwak, 2012).

As alterações celulares e teciduais podem ser importantes biomarcadores dos efeitos subletais da concentração de poluentes, facilitando a elucidação dos órgãos-alvo dos xenobióticos, evidenciando locais específicos com danos celulares (Chiang & Au, 2013). Essas mudanças na arquitetura normal dos tecidos podem ser visualizadas usando avaliação histopatológica.

Dentre os órgãos comumente observados em chironomideos quanto as alterações celulares e teciduais, estão aqueles do sistema digestivo, corpo gorduroso e túbulos de Malpighi. No sistema digestório, o intestino médio parece ser o mais influenciado. As três regiões que compõem o intestino médio possuem uma matriz peritrófica, membrana semipermeável que protege as células do intestino médio de danos mecânicos e químicos, mas que ainda assim, não impede a entrada de partículas (Holtof et al., 2019). A região I do intestino médio possui atividade secretora, transporte ativo de íons e fluídos, não relacionado a absorção de nutrientes (Pierson, 1956; Seidman et al., 1986). A região II do intestino médio tem por função a absorçãode nutrientes (Pierson, 1956), síntese proteica e reserva de glicogênio (Seidman et al., 1986). A região

III do intestino médio tem função de absorção de cátions, bem como de açúcares, gorduras e proteínas de pequeno peso molecular, que ocorre por processos passivos ou ativos (Pierson, 1956; Krantzberg & Stokes, 1990). O corpo gorduroso está distribuído entre a epiderme e os músculos intersegmentais e entre os órgãos e parece estar relacionado com a produção e armazenamento de hemoglobinas (Schin et al., 1977; Vafopoulou-Mandalos & Lauder, 1984), em processos de detoxificação (Lycett et al., 2006; Chung et al., 2009; Cruz-Landim, 2009), metabolismo energético como a síntese proteica, síntese de ácidos graxos e hidrocarbonetos para a cutícula (Cruz-Landim, 2009; Makki et al., 2014; Richardi et al., 2018).

Por outro lado, os túbulos de Malpighi tem função de transporte ativo de íons (Jarial, 1988) provavelmente relacionadas com trocas entre a hemolinfa e o sistema digestório. Caracteristicas em comum desses órgãos estão no contato próximo com o meio contaminado (sedimento externo ou sedimento ingerido) e intenso fluxo iônico ou de secreções, justificando a influência preferencial de danos nesses locais do organismo.

Dentre os contaminantes, os metais estão amplamente presentes em ambientes aquáticos, sendo geralmente persistentes nestes locais devido a reduzida capacidade de degradação biológica (Ali et al., 2019). Quando expostos, órgãos de animais aquáticos podem acumular estes elementos biodisponíveis (Tao et al., 2012; Moiseenko & Gashkina, 2020; Pourang, 2021). Metais pesados acumulados nos tecidos catalisam reações redox que geram espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem levar ao estresse oxidativo e, portanto, causar alterações bioquímicas e morfológicas (Martelli et al., 2006; Lushchak, 2011; Espinosa & Rivera-Ingraham 2016). Lesões teciduais são comumente encontradas em diferentes organismos expostos a metais (Sharma & Satyanarayan, 2011; Jerome et al., 2017; Khan et al., 2018; Naz et al., 2021). Em Chironomidae alterações com nanoparticulas envolveram a vacuolização e alterações na morfologia de células no intestino médio, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso parietal em Chironomus riparius (Stojanović et al., 2021). Com sedimento influenciado por mineração, Grueso-Gilaberth et al. (2020) observaram a regressão dos cecos gástricos, ruptura celular das células Cuénot, vacuolização, ruptura do citoplasma e alteração da borda de escova de diferentes células do intestino, células pericárdicas, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso e glândulas salivares, além da formação de grânulos em Polypedilum sp...

Contaminantes orgânicos podem ser de origem natural ou descarga indiscriminada de produtos químicos sintéticos (Thomaidl et al., 2015; Gwenzi &

Chaukura, 2018; Buell et al., 2021), podem sofrer transformações do ambiente aquático para sua degradação ou transformando em compostos ainda mais reativos (Richardi & Canonica, 2005; Canonica, 2007; Rabdonirina et al., 2015; Gendy et al., 2022), nos quais podem serem ingeridos ou absorvidos pelo organismo, bioacumulados nos tecidos e causarem danos teciduais (Bhavan & Geraldine 2000; Greenfield et al., 2008; Belek et al., 2022). Em *Chironomus sancticaroli* o hidrocarboneto fenantreno causou ruptura da borda em escova, regressão do ceco gástrico e redução da área do lúmen no intestino médio, o corpo gorduroso apresentou alteração nuclear e coalescência vacuolar nos trofócitos, enquanto os túbulos de Malpighi apresentaram redução da borda em escova e as glândulas salivares apresentaram vacuolização do citoplasma (Richardi et al., 2018). Em *Chironomus calligraphus* o piretróide cipermetrina causou vacuolização e desorganização de células epiteliais do intestino médio e o desenvolvimento diferenciado do corpo gorduroso (Lavarías et al., 2017).

Apesar da importância, há poucos relatos do impacto de múltiplas fontes de poluição sobre *C. sancticaroli*, e nenhum trabalho com este organismo na bacia do Rio Doce, um dos principais rios da região sudeste do Brasil. Diante deste cenário a investigação teve como objetivo compreender as possíveis consequências em diferentes biomarcadores bioquímicos e moleculares e histopatológias em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao sedimento de diferentes segmentos da bacia do Rio Doce, afetados por diferentes fontes de poluição.

#### 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar alterações subletais (biomarcadores bioquímicos, moleculares e alterações histopatológicas) de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica aos sedimentos da bacia do Rio Doce, MG/ES.

## 1.1.2 Objetivos específicos

Verificar alterações nas enzimas de biotransformação  $\alpha$  e  $\beta$  esterases e glutationa S-transferase em *Chironomus sancticaroli* expostos de forma subcrônica aos sedimentos

de diferentes localidades da bacia do Rio Doce.

Analisar potenciais alterações no sistema de defesa antioxidante através das atividades enzimáticas da superóxido dismutase e catalase em *Chironomus sancticaroli* expostos de forma subcrônica aos sedimentos de diferentes segmentos da bacia do Rio Doce.

Avaliar potenciais danos oxidativos em biomoléculas através da análise de peroxidação lipídica e danos no DNA em *Chironomus sancticaroli* expostos de forma subcrônica aos sedimentos de diferentes localidades da bacia do Rio Doce.

Verificar potenciais efeitos neurotóxicos através da alteração na atividade enzimática da acetilcolinesterase em *Chironomus sancticaroli* expostos subcronicamente aos sedimentos de diferentes localidades da bacia do Rio Doce.

Analisar os níveis de expressão gênica das isoformas de Hemoglobina C e E, e da Metalotioneina das larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao sedimento doRio Doce, em bioensaio de toxicidade subcrônica.

Compreender a relação entre os diferentes poluentes do Rio Doce e as respostas causadas em biomarcadores bioquímicos e moleculares.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. Biomarcadores bioquímicos

Antes do início das análises, foram realizados testes para averiguar o número mínimo de larvas necessárias para possibilitar uma quantificação da atividade enzimática dentro dos limites de detecção fornecidos pelo espectrofotômetro (Multiskan Sky Thermo Scientific™).

Para cada ponto de coleta e grupo controle foram avaliados 10 *pools* de quatro larvas. As larvas foram descongeladas e homogeneizados em 620  $\mu$ L de água Milli-Q (Morais et al., 2019). Para mensurar a atividade da acetilcolinesterase e os danos em DNA, alíquotas de 95  $\mu$ L e 60  $\mu$ L, respectivamente, de cada uma das amostras foram previamente separadas. O restante do homogenato das amostras foi centrifugado a 12000xg a 4°C em centrífuga refrigerada para as demais análises bioquímicas.

Foram preparadas alíquotas de amostras para cada enzima e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, tendo três

subréplicas para cada amostra (pool de larvas), e a leitura da absorbância e fluorescência (para danos em DNA) em espectrofotômetro de microplaca (comprimento de onda entre 190-850 nm).

A atividade da EST-α e EST-β foi analisada seguindo o protocolo de Valle e Montella (2006). Para ambas foram adicionados 10 µl de amostra (para o branco foi substituído por 10 μL de água Milli-Q). Em seguida, para a EST-α foram adicionados 200  $\mu$ l de α-naftil acetato/Nafosfato (0,3 mM), utilizando o α-naftol (0,3 mg.L<sup>-1</sup>) como controle positivo. Para a EST-β foram adicionados 200 μL de β-naftil acetato/ Nafosfato (0,3 mM), utilizando β-naftol (0,3 mg.L<sup>-1</sup>) como controle positivo. As placas foram incubadas por 15 minutos em temperatura e luz ambiente, seguido da adição de 50 µl do corante Fast Blue (0,3%), e uma segunda incubação por cinco minutos. Em seguida foi realizada leitura end point com comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em nmol  $\alpha$ - naftol/ mg ptn /min para EST- $\alpha$  e nmol  $\beta$ - naftol/mg ptn/min para EST- $\beta$ . Uma curva padrão foi preparada para converter os valores de absorbância em conteúdo de α/βnaftol. Para a curva foram utilizadas asmassas de 0 μg, 1 μg, 2 μg, 3μg, 4 μg e 5μg de  $\alpha/\beta$ -naftol. Para isso foram adicionados volumes de 0 μL, 2 μL, 4 μL, 6 μL, 8 μL e 10 μL de α/β-naftol em duplicata e acrescentado água Milli-Q para completar um volume total de 10 µl de amostra. Posteriormente, seguiu o mesmo procedimento de preparação e leitura das microplacas das análises das esterases.

Para determinar a atividade da GST foi utilizado o protocolo de Keen et al. (1976). Foram adicionados 15 μL de amostras (para o branco foi substituído por 15 μL de água Milli-Q) e 195 μL de solução composta por glutationa reduzida (GSH 10 mM) e clorodinitrobenzeno (CDNB; 21 mM). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 340 nm por 20 minutos a cada um minuto. Os resultados foram expressos em μmoles/mg ptn/min.

A atividade da SOD foi analisada de acordo com o protocolo proposto por Gao et al. (1988). Para isso, 40 μL de amostras (no branco foi substituído por 40 μL de água Milli-Q) foram preparadas em alíquotas, em duplicata, em microtubos de centrifugação de 1,5 ml. Em seguida, foram adicionados 885 μL de tampão tris de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; pH 8,0; 5mM) e 50 μL de ácido pirogálico. Os microtubos foram incubados por 30 minutos e foi adicionado 25 μL de HCI (1 N), que ocasionou a redução da reação entre a enzima e o substrato. Microplacas controle foram preparadas, seguindo os mesmos procedimentos com exceção do processo de incubação (ausente). Em

seguida, 300 µL da solução foram adicionados à placa, em triplicata, sendo realizada a leitura em 440 nm de comprimento de onda. Os resultados foram expressos em unidades (U) de SOD/mg de proteína.

A atividade da CAT foi determinada segundo o protocolo proposto por Aebi (1984). Foram adicionados 5μL de amostra e 295 μL de solução de reação (água Milli-Q; Tampão Tris EDTA; peróxido de hidrogênio a 30%; sem branco). A leitura foi realizada com microplaca (TPP Zellkulturtestplatte 96F) em comprimento de onda de 240 nm por cinco minutos a cada 15 segundos. Os resultados foram expressos em μmol/min/mg de proteína<sup>-1</sup>.

A quantidade de hidroperóxidos, produtos primários da peroxidação lipídica foi averiguada seguindo o protocolo de Jiang et al. (1992). Foram adicionados 70 μL de amostra e 70 μL de metanol (P.A.) em microtubos de centrifugação de 1,5 ml. As amostras foram centrifugadas a 5000xg por cinco minutosa 4°C. Foram transferidos para um novo microtubo 100 μl do sobrenadante (para o branco foi substituído por 100 μl de metanol), no qual foram adicionados 900 μl de reativo de Fox 2 (solução metanólica (xilenol Orange 0.1 mM; hidroxitolueno butiladocristalino (BHT) 4 mM; metanol P.A.); solução de sulfato ferroso amoniacal 2500 μM (H2SO4; água Milli-Q. Os microtubos de centrifugação foram homogeneizados e incubados no escuro por 30 minutos, sendo agitados em vórtex a cada três minutos. Posteriormente a solução foi transferida para microplaca de 96 poços, em triplicata, com volume de 300 μl cada. A leitura foi realizada a 560 nm e os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos/mg de proteína.

A quantidade de danos em DNA foi analisada segundo o protocolo de Olive (1988). A análise foi realizada a partir de 25 μL de amostra aliquotada em um microtubo de centrifugação de 1,5 ml. Foram adicionados 200 μL de Solução dodecilsulfato de sódio (SDS) 2% (EDTA 10mM; Trisbase, PM=121,1 g/mol; hidróxido de sódio, NaOH; PM=40g/mol e dodecil sulfato de sódio, SDS 2%) para o rompimento das membranas nucleares. A solução foi agitada por inversão e deixada repousar porum minuto. Em seguida foi adicionado 200 μL de cloreto de potássio (KCl a 0,12 M) para a precipitação do DNA integro. Após agitação por inversão, o microtubo foi colocado em banho maria a 60 °C por 10 minutos. Em seguida foi agitado por inversãoe incubado por 30 minutos a 4 °C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 8000g por cinco minutos a 4°C. Para a leitura, foram adicionados 50 μL do sobrenadante seguidos de 150 μL de reativo Hoechst 1 μL/ml composto por Stock do reagente Hoechst 1 mg/ml (Hoescht

33342, Trihydrocloride, Trihydrate – 10 mg/ml e metanol) e Tampão (Cloreto de Sódio (NaCl a 0,4 M); Colato de sódio (4 mM) e tris acetato (0,1 M) com o pH 8,5) em triplicata em microplaca de fundo preto para detecção de fluorescência. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 360nm para excitação e 460nm para emissão, por cinco minutos, em agitação constante (700rpm). A análise da curva padrão foi baseada no protocolo de Olive (1988) e adaptada pela Dra Flávia Yoshie Yamamoto (NEPEA-UNESP). Foi utilizado padrão de espermade salmão (Sigma-Aldrich®, solução estoque de esperma de 1mg/ml e TE1X) nas quantidades de 0 μg/ml, 6,25 μg/ml, 12,5 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 500 μg/ml e 1.000 μg/ml diluído com tampão de homogeneização (Tris base- HCl 10mM (PM=121,19mol) e EDTA 1mM (PM=380,2 g/mol) com pH 8,0) em concentração inicial de 1 mg/ml e diluído seriadamente conforme a concentração de esperma. Para a curva, 50 μL solução de cada concentração de DNA, foram pipetados em triplicata em microplaca para fluorescência, seguidos da adição de150 μL de Reagente Hoechst 1 mg/ml para leitura que seguiu o mesmo protocolo das placas dedanos em DNA.

A atividade enzimática da AChE foi analisada seguindo o protocolo de (Ellman et al., 1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Foram adicionados 25 μL de amostras (para o branco foi substituído por 25 μL de água Milli-Q), 200 μL de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB; 0.75 mM) e 50 μL de iodetoacetilticolina (ATC;10 mM). Logo após a pipetagem, a placa foi incubada em temperatura e luz ambiente por 30 minutos. A leitura foi realizada a cada 30 segundos por cinco minutos, com comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em μmoles/mg ptn/min.

A quantidade de proteínas totais foi determinada para normalização das amostras seguindo o protocolo de Bradford (1976). Foram adicionados 10 μL de amostras, 10 μL de Albumina Sérica Bovina (BSA) para o controle positivo e 250 μL de corante Bradford (1 Bradford: 5 de água Milli-Q). A leitura foi obtida em comprimento de onda de 620 nm. Para a curva padrão de BSA foram utilizadas as quantidades de 0 μg, 2,5 μg, 5 μg, 7,5 μg, 10 μg e 15 μg de BSA diluídas seriadamenteem água Milli-Q (concentração maior: 150 μL da solução estoque (2 mg/ml de BSA) +50 μL de água Milli-Q e branco 200 μL de água Milli-Q). Em seguida, 10 μL de amostra foram pipetados, em quadriplicatas em microplacas de 96 poços, para cada concentração. A leitura da absorbância seguiu o mesmo protocolo da proteína total.

## 2.2. Expressão gênica

#### 2.2.1. Amostras

Para cada um dos pontos de coleta e controles foi realizada a análise da expressão gênica de 10 pools de amostras, formado por quatro larvas cada. Totalizando 320 larvas em 80 pools utilizadas para todos os tratamentos e controles.

## 2.2.2. Extração de RNA total

Para a extração do RNA total das larvas foi utilizado o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen®). As larvas foram retiradas do ultrafreezer -80°C e distribuídas em pools de quatro larvas em microtubos de 2 ml. Aos tubos foram adicionados 350 µl de tampão RLT de lise celular fornecidos pelo kit de extração. As larvas foram homogeneizadas pela maceração das larvas com um pistilo autoclavado. As demais etapas da extração seguiram o protocolo do kit de extração para obtenção de 50 µl de RNA total de cada amostra.

As concentrações de cada amostra foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000® a 340 nm e um gel de agarose a 1% foi realizado para a verificação da qualidade do RNA (80 V, 160 mA, 120 w por 30 minutos).

### 2.2.3. Tratamento com DNAse

As amostras foram tratadas com DNAse I (Sigma-Aldrich catálogo nº AMPD1) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Foram tratados 6,096 µg de RNA de cada amostra. Para isso foi utilizado para cada amostra: 3 µl do buffer 10X, 3 µl de DNase I, 24 µl de RNA + água (volumes variáveis de acordo com cada amostra), incubou-se por 15 mim a temperatura ambiente, logo após foi acrescentado 3 µl da solução de parada e incubou-se por 10 mim a 70°C. As amostras foram colocadas no gelo para então a concentração de RNA ser quantificada novamente em espectrofotômetro NanoDrop®. Outro gel de agarose a 1% foi realizado para a verificação da qualidade do RNA (Fig.1).

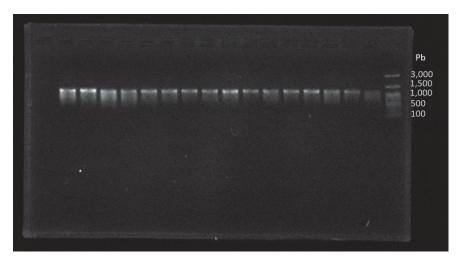


Figura 1. Gel de agarose com amostras de RNA dos pontos GOV e AIM para averiguação da integridade após tratamento com DNAse. Pb = número de pares de bases do fragmento.

# 2.2.4. Transcrição reversa (cDNA)

Para a transcrição reversa de RNA para o DNA complementar (cDNA) foram utilizados 1405.8 μg de RNA tratado com DNase I. A reação final atingiu um volume de 20 μl, sendo 14,2 μl de RNA + água (volumes variáveis de acordo com a amostra)e 5,8 μl dos seguintes reagentes: 2 μl do RT buffer 10X, 0,8 μl de dNTP Mix, 2 μl do RT random primers 10x, 1 μl de a enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; número de catálogo 4368814). As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL (Axygen®) e em termociclador BioRad® seguindo o seguinte protocolo: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C. Após esta etapa as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

### 2.2.5. Primers

As sequências dos *primers* (Tab. I) dos genes de interesse foram obtidas a partir de Rebechi et al. (2021) para hemoglobinas e  $\beta$ -actin, e Park & Kwak (2012) para metalotioneína.

O teste de temperatura de anelamento dos primers foi realizado a partir de uma PCR convencional com gradiente de temperaturas (seis temperaturas entre 48°C e 63°C), sendo seis cópias para cada um dos primers adicionando 1.5 µL de cDNA, 1.2µL de Buffer 10X, 0.1 µL de Taq DNA Polymerase, 0.4 µL de dNTP (10 mM), 0.8 µL de

MgCl2 (25 mM),  $0.3 \mu L$  de primer foward (10  $\mu$ M) e  $0.3 \mu L$  de primer reverse (10  $\mu$ M). Os ciclos foram de: 94°C por 3 minutos, 94°C por 30 segundos, 48°C-60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (39x), 72 °C por 5 min e 4°C de "hold  $\infty$ ". Para a visualização da melhor temperatura de anelamento dos primers foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (70 V, 140 mA, 120 w por 30 minutos). A temperatura definida para metalotioneína foi 54°C e para hemoglobinas 60°C.

Foi realizado um teste para se calcular a eficiência dos primers, os quais apresentaram uma eficiência mínima entre 90 e 110% para serem considerados. Uma série de cinco diluições 1:4 cada foi realizada utilizando-se uma mesma amostra e procedeu-se como o descrito anteriormente para a realização da expressão gênica. Para cada diluição foram utilizadas três réplicas, tendo também três controles negativos e a eficiência de cada primer foi então calculada através da fórmula [*Eficiência* =  $10^{\circ}$ (-1/slope)-1]\*100 (Derveaux et al., 2010). A eficiência de  $\beta$ -actinaa 54°C foi de 92.06%, de  $\beta$ -actina a 60°C foi de 107.11%, de metalotioneína foi de 93.74%, de HbC foi de 92.67% e de HbE foi de 107.04%.

Tabela I: Sequências dos primers utilizados para expressão gênica da HbC, HbE, MT e  $\beta$ -actina em *Chironomus sancticaroli.* 

Nome	Primer Forward	Primer Reverse	Size (pb)	Ref.
HbC	ACTGGGATTCCACGAGCTTT	TTCGCCACACATGCTGGAA	137	Rebechi et al. 2021
HbE	GCTGGGGCATTTGATTCGTT	TTCGCTGGAAAGGATGTTGC	114	Rebechi et al. 2021
MT	GGGCTGCAAATGTTGTTCACA	GCAGCAGTTCTTGCAGCATT C	130	Park & Kwak 2012
β-actin	GAACAAGAAATGGCCACCGC	GAGTGATTCTGGGCAACGGA	104	Rebechi et al. 2021

## 2.2.6. Reação de qPCR

A reação da PCR quantitativa apresentou um volume final de 10 μl, sendo 1 μl de cDNA (cada amostra foi diluída adicionando 40 μl de água Milli-Q) e 9 μl do mastermix contendo: 5 μl de Sybr Green PCR master mix (Applied biosystems® catálogo nº A25742); 0,30 μl do primer forward a 10 μM (Mt e Act pela IDT® e hemoglobinas pela Eurofins®); 0,30 μl do primer reverse a 10 μM (Mt e Act pela IDT® e hemoglobinas pela Eurofins®) e 3,4 μl de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL (Axygen®), no equipamento Rotor-Gene Q da Qiagen®. Para a metalotioneína

foi utilizado o seguinte protocolo:  $50^{\circ}$ C por 2 min,  $94^{\circ}$ C por 4 min, 40 ciclos de  $94^{\circ}$ C por 30s,  $54^{\circ}$ C por 30s,  $72^{\circ}$ C por 30s. Para as hemoglobinas foi utilizadoo protocolo:  $50^{\circ}$ C por 2 min,  $94^{\circ}$ C por 2 min, 40 ciclos de  $95^{\circ}$ C por 30s,  $60^{\circ}$ C por 30s,  $72^{\circ}$ C por 30s. Para o gene referência  $\beta$ -actina foram utilizados os dois protocolos ( $54^{\circ}$ C e  $60^{\circ}$ C) em corridas diferentes. Os resultados foram visualizados e analisados no programa Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1. A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada usando o método 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001) e normalizada utilizando um gene referência (actina).

# 2.3. Histologia

Dez larvas de cada ponto e controles foram fixadas em solução Duboscq (ácido pícrico 1g + formaldeído 60ml + ácido acético glacial 15ml + 150 ml de álcool etílico p.a. a 80%) por 24 horas. Após a fixação as larvas foram lavadas em álcool 70% por 30 minutos para remoção da solução fixadora, desidratadas em série alcoólica (80%, 90%, 95%, 100%) por 45 minutos em cada solução, diafanizadas em xilol (1:1 de xilol + álcool por 15 minutos, xilol puro por 10 min, xilol puro por 3 minutos), infiltradas comparafina (3 horas, 50°C) e emblocadas. Cortes de 7 µm de expessura foram colocados em banho maria, colados (albumina de Mayer) em lâminas de microscopia e secados a temperatura ambiente. Todos os cortes obtidos de todas as larvas foram utilizados afim de abordar toda a extensão do corpo do individuo nas diferentes secções. As secções foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Após a montagem das lâminas com Entenllan, todas as secções histológicas foram analisadas (1600 lâminas com 5 secções em cada), principalmente direcionando as buscas nas glândulas salivares, sistema digestório, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso, onde foram observadas alterações em trabalhos histológicos com a mesma espécie (Richardi et al., 2018; Signorini-Souza et al., 2020. As alterações foram documentadas em fotomicroscópio óptico de luz (Modelo Scope.A1, Marca Carl Zeiss) usando uma câmera digital (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss) e processadas com o software Axion Vision SE64.

#### 2.4. Análise dos dados

Distribuição normal e homogeneidade dos dados foram testadas pelos testes Shapiro Wilk (p < 0,05) e Levene`s (p < 0,05), respectivamente, através do programa Past 4.02. Os dados paramétricos, foram avaliados pelo teste ANOVA (p  $\leq$  0,05) de um fator com *aposteriori* de Tukey e correção de Bonferroni, sendo analisados os biomarcadores em relação aos pontos de coleta do sedimento e controles.

Os resultados dos biomarcadores também foram integrados por meio do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) descrito por Beliaeff e Burgeot (2002), a partir de índices criados da normalização de cada valor de resposta de biomarcador individual. Para isso o resultado de cada análise de atividade enzimáticae expressão gênica foram divididos pelo valor do grupo controle (o grupo controle é dividido por ele mesmo resultando em valor igual a 1). Com o objetivo de reduzir a variância, o resultado foi logaritimizado e após a logaritimização (Yi) foram obtidas a média (µ) e o desvio padrão (s). Os valores de Yi foram padronizados pela fórmula Zi = (Yi - µ) / s, e a diferença entre Zi e Z0 (controle) foram calculadas para determinar os valores de (A). Os valores de (A) representam o resultado atribuído para cada biomarcador calculado. O IBR é estimado para cada grupo pela soma dos valores de (A) convertidos em valores absolutos (S). Os resultados são apresentados como gráficos de radar que indica o desvio de todos os biomarcadores em relação ao controle (0). Os valores acima da linha do zero representam a indução dos biomarcadores, enquanto os valores abaixo de zero representam inibição dos biomarcadores.

Para análise exploratória entre os biomarcadores bioquímicos e moleculares analisados na presente pesquisa, a frequência das alterações histológicas, a granulometria (%) do sedimento (lodo e argila <63 µm; areia muito fina 63-125 µm; areia fina 125-250 µm; areia média 250-500 µm; areia grossa 0.5-1 mm; areia muito grossa >1 mm; matéria orgânica) e os contaminantes químicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais e piretroides) encontrados nos pontos ao longo da bacia do Rio Doce, foram feitas análises de componentes principais (PCAs) utilizando os pacotesVegan, FactoMineR, Factoextra, Factoshiny e ggplot2, no software RStudio 4.2.1. Para determinar os eixos importantes das PCAs foi utilizado o Método de Broken Stick. Para análise de correlação dos biomarcadores e dos elementos inorgânicos bioconcentrados nas larvas foram feitas análises de correlação de Spearman considerando o valor de R para determinar a correlação.

#### 3. RESULTADOS

### 3.1. Biomarcadores bioquímicos

Foram observadas alterações nos marcadores bioquímicos após a exposição subcrônica (8 dias) das larvas de *C. sancticaroli* aos sedimentos da bacia do Rio Doce em relação aos grupo controle (Fig. 2).

Com relação às enzimas de biotransformação, verificou-se que a atividade da EST-α apresentou aumento significativo da atividade nos pontos GUA (p=0,001), NAQ (p=0,003), REF (p=0,0102) e GOV (p=0,004) em relação aos seus respectivos controles. A atividade da EST-β apresentou aumento significativo de atividade nos pontos REF (p=0,0216) e GOV (p=0,0169) em relação ao controle. Por outro lado, a GST, apresentou redução significativa da atividade nos pontos CAN (p=0,0026) e NAQ (p=0,001) em relação aos seus controles.

A exposição aos sedimentos também demonstrou afetar significativamente a atividade das enzimas antioxidantes mensuradas. A SOD apresentou redução significativa de atividade enzimática nos pontos NAQ (p=0,009) e REF (0,0107) em relação aos seus respectivos controles. Por outro lado, CAT teve um aumento da atividade enzimática nos pontos CAN (p=0,0046) e NAQ (p=0,0347) em relação aos seus respectivos controles.

Quanto aos danos nas biomoléculas, observou-se maiores níveis de LPO no ponto GOV (p=0,0283) em relação ao grupo controle, e para os danos em DNA não houve diferença significativa entre os diferentes pontos em relação aos grupos controles.

A atividade da AChE sofreu redução significativa nos pontos de coleta CAN (p=0,0347), NAQ (p=0,0042) e REF (p=0,0290) em relação aos seus respectivos controles.

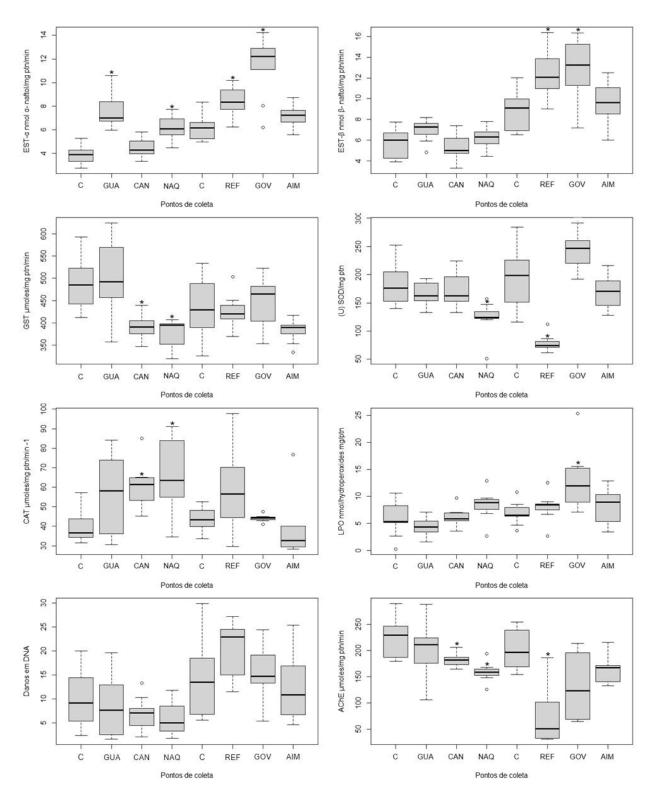


Figura 2. Respostas bioquímicas de larvas de Chironomus sancticaroli expostas por oito dias a diferentes sedimentos da bacia do Rio Doce (Minas Gerais e Espiríto Santo). Atividade enzimática de  $\alpha$ -Esterase (EST- $\alpha$  nmol  $\alpha$ -naftol/mg ptn/min),  $\beta$ -esterase (EST- $\beta$  nmol  $\beta$ -naftol/mg ptn/min), Glutationa S-Transferase (GST  $\mu$ moles/mg ptn/min), Superóxido dismutase (SOD (U) SOD mg/ptn), Catalase (CAT  $\mu$ mol/min/mg de proteína-1) e acetilcolinesterase (AChE  $\mu$ moles/mg ptn/min). Peroxidação lipídica (LPO nmol hidroperóxidos mg/ptn), Danos em DNA. Sedimento de exposição: Controle (C). Gualaxo do Norte (GUA). UHE Candonga (CAN). Naque (NAQ). Referência (REF). Governador Valadares (GOV). Aimorés (AIM). \* = pontos que apresentaram diferença significativa no teste a posteriori de Tukey (p<0,05).

# 3.2 Biomarcadores genéticos

Diferenças significativas na expressão gênica de duas isoformas de hemoglobinas (HbC e HbE) e da proteína metalotioneína (MT) também foram observadas após a exposição aos sedimentos da bacia do Rio Doce (Fig. 3) em relação ao controle.

A expressão gênica de HbC aumentou significativamente nos pontos (p=0.0002), CAN (p=0,0026), NAQ (p=0,0056), REF (p=0,0069) e AIM (p=0,0004) em relação aos seus respectivos controles.

A expressão gênica de HbE reduziu significativamente nos pontos REF (p=0,004), GOV (p=0,0007) e AIM (p=0,0062) em relação ao controle.

A expressão gênica de MT reduziu significativamente nos pontos CAN (p=0.0048), NAQ (p=0.0008) e GOV (p=0.003) em relação aos seus respectivos controles.

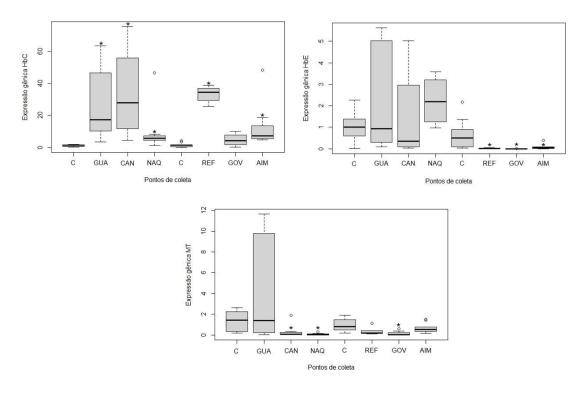


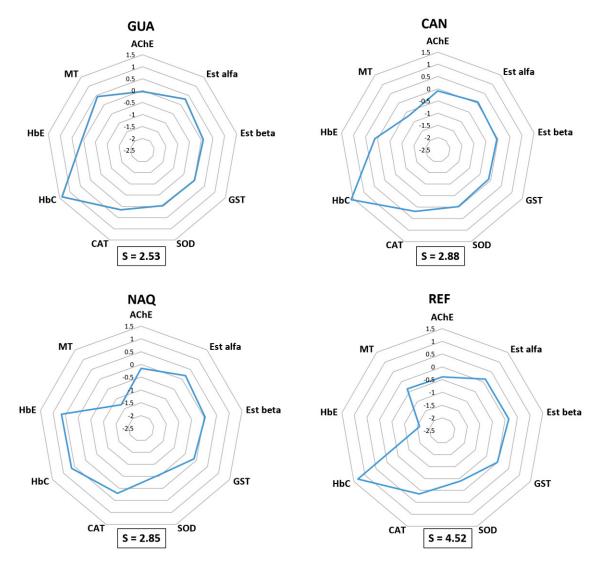
Figura 3. Respostas genéticas de larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas por oito dias a diferentes sedimentos da bacia do Rio Doce (Minas Gerais e Espiríto Santo). Expressão gênica das isorformas de hemoglobinas C (HbC) e E (HbE) e da metalotioneina (MT). Sedimentos de exposição: Controle (C). Gualaxo do Norte (GUA). UHE Candonga (CAN). Naque (NAQ). Local referência (REF). Governador Valadares (GOV). Aimorés (AIM). \* = pontos que apresentaramdiferença significativa no teste a posteriori de Tukey (p<0,05).

# 3.3 Índice Integrado de Biomarcadores

A integração das respostas obtidas das análises enzimáticas e expressão gênica a partir do índice Integrado de Biomarcadores mostrou que os pontos do médio Rio Doce apresentaram os maiores scores (S) de alteração dos biomacadores em relação ao controle (Fig. 4).

Foi observado aumento da expressão da HbC nos pontos do alto Rio Doce (GUA e CAN). No ponto GUA houve também maior expressão gênica de MT.

Nos indivíduos expostos aos sedimentos do médio Rio Doce é possível observar uma maior influência nas enzimas de biotransformação com o aumento da atividade das esterases em REF e GOV e redução de GST em NAQ, e nos mecanismos de estresse oxidativo com redução de atividade de SOD e aumento da atividade de CAT em NAQ e REF.



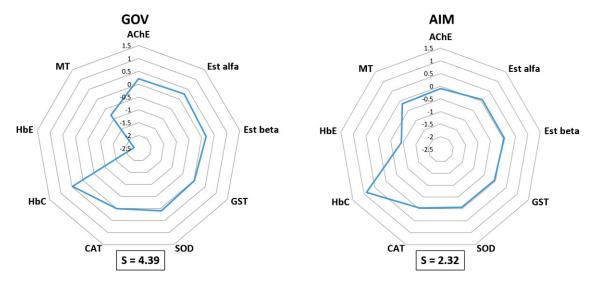


Figura 4. Indíce Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) para cada ponto de coleta do sedimento em que as larvas de *Chironomus sancticaroli* foram expostas ao longo de oito dias. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Controle (C). Gualaxo do Norte (GUA). UHE Candonga (CAN). Naque (NAQ). Local referência (REF). Governador Valadares (GOV). Aimorés (AIM). O valor de S representa o resultado da soma dos valores atribuídos a cada um dos biomarcadores em relação ao controle. Os resultados são apresentados como gráficos de radar indicam o desvio de todos os biomarcadores em relação ao controle. Os valores acima da linha do zero representam a indução dos biomarcadores, enquanto os valores abaixo de zero representam inibição dos biomarcadores. Quanto maior o valor de S, maior acúmulo de alteração dos biomarcadores em exposição ao sedimento do ponto de coleta indicado.

## 3.4. Histologia

Foram observadas diferentes alterações histológicas nos cecos gástricos, intestino médio, nas células do corpo gorduroso e nos túbulos de Malpighi (Tab. II) nas larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce.

Nos cecos gástricos foi observado resíduos de sedimento na região basal de células de 40% dos indivíduos expostos ao sedimento do ponto NAQ (Fig. 5B), diferente das larvas controles que não apresentaram presença de sedimento intracelularmente (Fig. 5A).

No sistema digestório, a região II do intestino médio apresentou acúmulo de grânulos na região basal das células (Figs. 5D-F), exceto em larvas expostas ao ponto AIM. Na região I e II do intestino médio das larvas expostos aos sedimentos foi possível observar a presença de resíduos de sedimento no citoplasma das células (Figs. 6B, D-E). Em condições controle nenhuma larva apresentou grânulos e resíduosde sedimento nas células intestinais (Figs. 5C e 6C). Na região III do intestino médio foi possível observar alteração na morfologia das células, observada pelo estreitamento longitudinal

das células (Fig. 7B). Nos controles as células apresentaram distinção clara em relação as células vizinhas, através da região apicalestar mais arredondada (Fig. 7A).

Em relação ao corpo gorduroso, tanto trofócitos (Fig. 8B), quanto enócitos (Fig.8D, F) apresentaram vacuolização do citoplasma em larvas expostas ao sedimento de todos os pontos. Nenhum controle apresentou vacuolização evidente (Figs. 8A, C,E). Os trofócitos parietais apresentaram aumento de tamanho das células (Fig. 9B) exceto em AIM e os trofócitos parietais e viscerais apresentaram alterações nucleares em todos os pontos (Fig. 9D). Os controles apresentaram células de tamanho e núcleo uniformes (Figs. 9A, C).

Em relação aos túbulos de Malpighi, quatro larvas expostas ao sedimento do ponto REF apresentaram resíduos de sedimento nas células (Fig. 10B). Em nenhum controle houve presença destes resíduos nos túbulos (Fig. 10A).

Tabela II. Alterações histológicas observadas em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas por oitodias ao sedimento de seis pontos ao longo da bacia do Rio Doce. Pontos localizados no Estado de Minas Gerais: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV). Ponto localizado no Estado do Espírito Santo: Aimorés (AIM). C = Controle. Ao todo foram observadas dez larvas de cada ponto e controle.

Sistema	Alteração		Pontos					
		С	GUA	CAN	NAQ	REF	GOV	AIM
	Grânulos nos	-	-	-	-	4/10	-	-
	cecos							
	gástricos		0/40	0/40	0/40	40/40	0/40	
	Grânulos na região II do mesêntero	-	6/10	6/10	6/10	10/10	6/10	-
Sistema	Acúmulo de sedimento		2/10	2/10	8/10	4/10	2/10	2/10
digestório	na região I do mesêntero	-	2/10	2/10	0/10	4/10	2/10	2/10
digostorio	Acúmulo de sedimento		_	2/10	6/10	4/10		_
	na região II do			2/10	0/10	1710		
	mesêntero							
	Alteração na morfologia	-	-	2/10	-	-	2/10	2/10
	celular do epitélio na							
	região III do mesêntero							
	Vacuolização .	-	8/10	8/10	8/10	8/10	10/10	2/10
	d							
Corno	ocitoplasma de trofócitos							
Corpo gorduroso	Vacuolização		6/10	4/10	6/10	10/10	10/10	4/10
gordaroso	vacuolização d	-	0/10	4/10	0/10	10/10	10/10	4/10
	ocitoplasma de enócitos							
	Trofócitomegalia	-	6/10	6/10	10/10	10/10	8/10	-
	Alterações	-	8/10	6/10	6/10	10/10	10/10	2/10
	nucleare							
	snos trofócitos							
Túbulos de	Grânulos no epitélio	-	-	-	4/10	-	-	-
Malpighi	celular dos túbulos de							
	Malpighi							

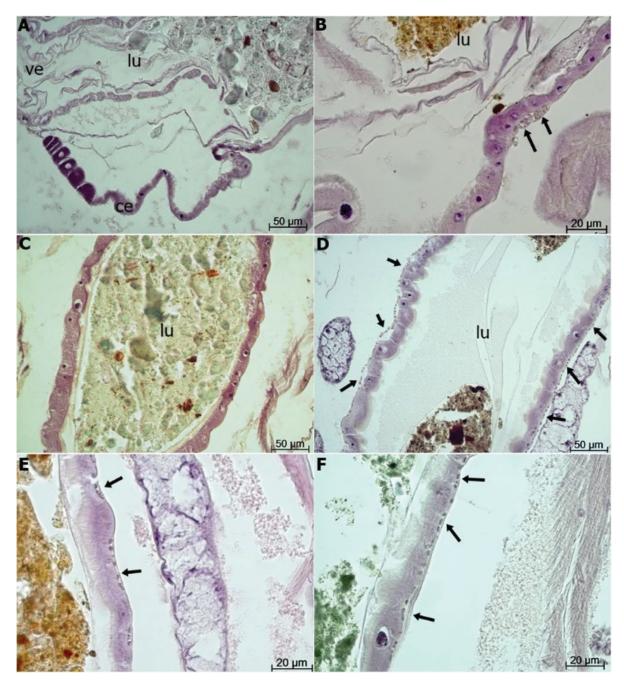


Figura 5. A-B: Região da válvula estomodeal da larva *de Chironomus sancticaroli*. C-F: Região II do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. A: corte longitudinal dos cecos gástricos da larva evidenciando a válvula estomodeal e o lúmen da região I do intestino médio de larva controle. B: corte longitudinal de larva exposta ao sedimento do ponto REF da bacia do Rio Doce evidenciando resíduos de sedimento agrupados na região basal da célula do ceco gástrico (seta). C: Corte longitudinal da região II do intestino médio de larva controle. D-F: Corte longitudinal da região II do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto REF (D) e CAN (E-F) evidenciando grânulos agrupados na região basal das células indicados pelas setas pretas. ce: cecos gástricos; lu: lúmen do intestino; ve: válvula estomodeal.

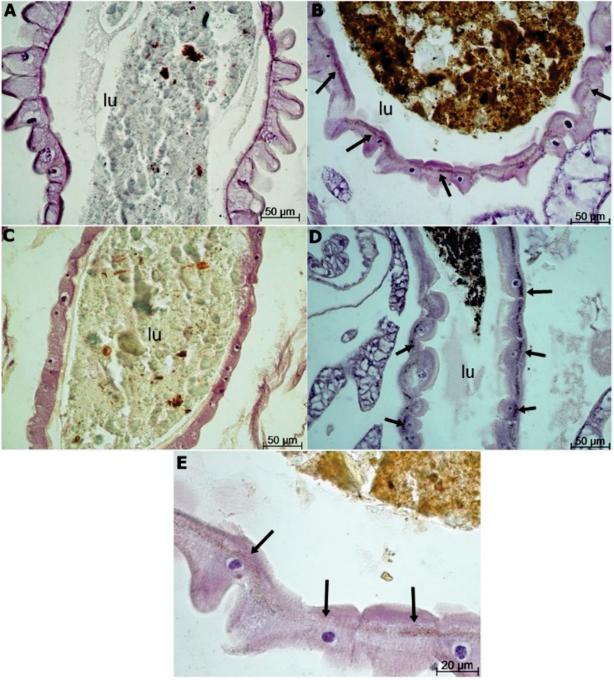


Figura 6. A-B,E: Região I do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. C-D: Região II do intestino médio de larva de *Chironomus sancticaroli*. A: corte longitudinal da região I do intestino médio de controle. B e E: corte transversal da região I do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto REF da bacia do Rio Doce evidenciando resíduos de sedimento no citoplasma das células (setas). C: Corte longitudinal da região II do intestino médio de larva controle. D: Corte longitudinal da região II do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto NAQ evidenciando vacuolização do citoplasma e resíduos de sedimento no citoplasma das células (setas). lu: lúmen do intestino.

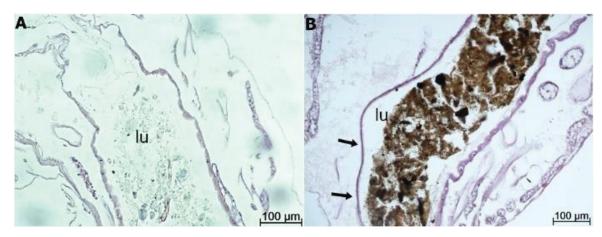


Figura 7. Região III do intestino médio de larva de *Chironomus sancticaroli*. A: Corte longitudinal da região III do intestino médio de larva controle. B: Corte longitudinal da região III do intestino médio de larva exposta ao sedimento do ponto GOV evidenciando alteração na morfologia das células, observada pelo estreitamento longitudinal das células (setas). lu: lúmen do intestino.

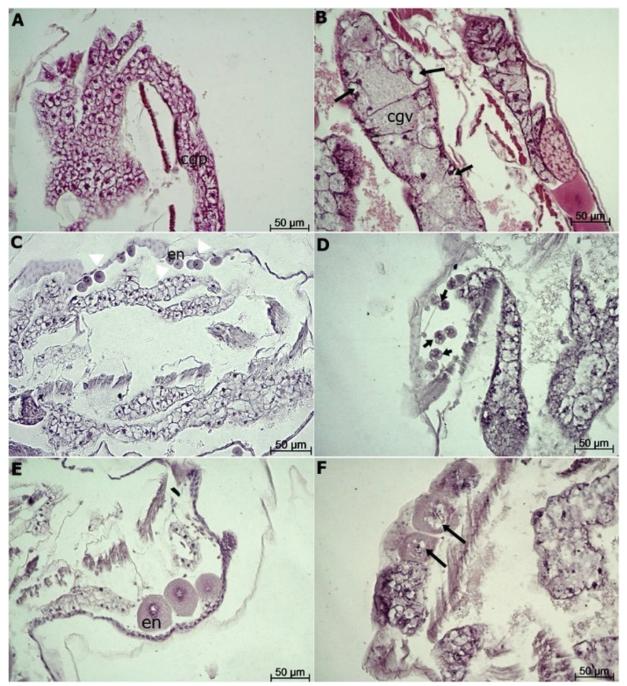


Figura 8. Corpo gorduroso da larva de *Chironomus sancticaroli* em corte lingitudinal. A: Corpo gorduroso de larva controle evidenviando os trofócitos. B: Corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto CAN da bacia do Rio Doce evidenciando vacuolização no citoplasma dos trofócitos (setas pretas). C: Corpo gorduroso de larva controle evidenciando os enócitos pequenos que se encontram em grandes grupos (cabeça da seta em branco). D: Corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto NAQ evidenciando vacuolização no citoplasma dos enócitos pequenos (setas pretas). E: Corpo gorduroso de larva controle evidenciando os enócitos maiores que se agrupam com três ou quatro células. F: Corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto CAN evidenciando vacuolização no citoplasma dos enócitos maiores (setas pretas). cgp: corpo gorduroso parietal; cgv: corpo gorduroso visceral; en: enócito.

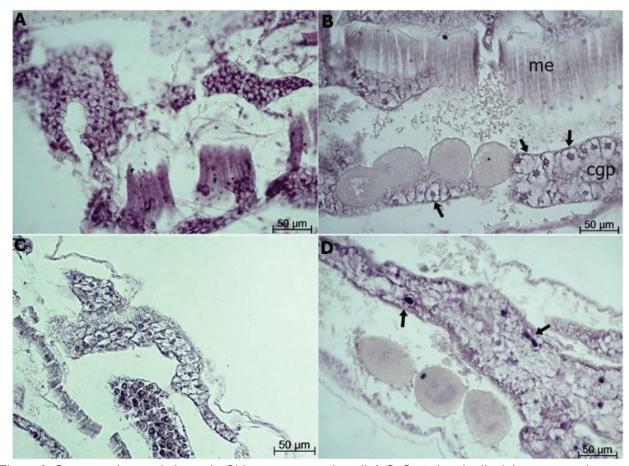


Figura 9. Corpo gorduroso da larva de *Chironomus sancticaroli*. A,C: Corte longitudinal do corpo gorduroso de larva controle evidenciando os trofócitos. B: Corte longitudinal do corpo gorduroso de larva exposta ao sedimento do ponto NAQ da Bacia do Rio Doce evidenciando hipertrofia (aumento do tamanho) dos trofócitos parietais (setas). D: Corte longitudinal do corpo gorduroso de larva exposta aosedimento do ponto REF evidenciando alterações nucleares nos trofócitos (setas). cgp: corpo gorduroso parietal; ct: cutícula; me: músculo.

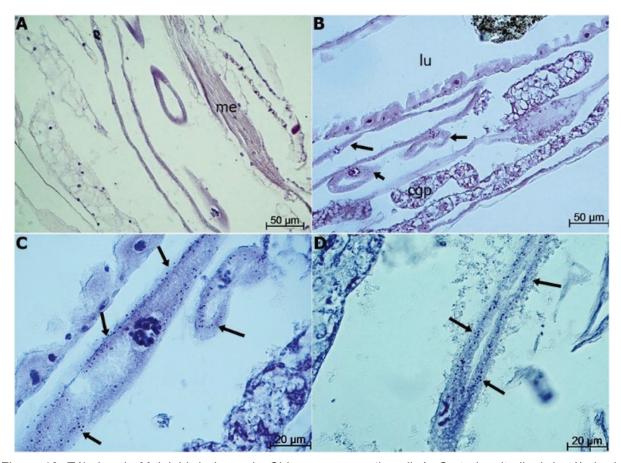


Figura 10. Túbulos de Malpighi da larva de *Chironomus sancticaroli*. A: Corte longitudinal do túbulo de larva controle. B-D: Corte longitudinal do túbulo de larvas expostas ao sedimento do ponto NAQ da Bacia do Rio Doce evidenciando resíduos de sedimento no citoplasma das células (setas). cgp: corpo gorduroso parietal; me: músculo.

### 3.5. Análises multivariadas

A PCA para todos os contaminantes analisados no sedimento (HPAs, matéria orgânica, metais e piretróides em Yamamoto et al., 2023b) e os biomarcadores (Fig. 11) explicou 40,0% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), seguido por 20,5% da variação dos dados para o segundo componente (Dim2), 12,6% para o terceiro componente e 9,8% para o quarto componente.

Os locais do médio Rio Doce (NAQ e GOV) apresentaram os maiores níveis da maioria dos contaminantes orgânicos, exceto X1MNaf e Naf que se encontrou em maiores níveis em GUA do alto Rio Doce. O médio Rio Doce apresentou ainda maior influência nas alterações das esterases, responsáveis pela biotransformação de compostos orgânicos e da SOD relacionada à atividade antioxidante. Além da peroxidação lipídica, dano ocasionado pelo estresse oxidativo.

O alto Rio Doce apresentou maiores níveis de Mn, Cd, Fe, Hg e As no sedimento e o maior nível da expressão gênica da metalotioneína e neurotoxicidade pela inibição da atividade de AChE (Fig. 12; Tabs. S1 e S2)

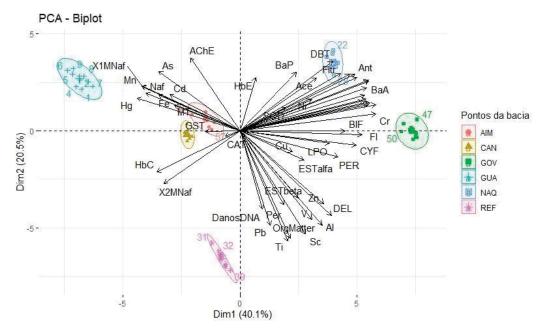


Figura 11. Análises de Componentes Principais (PCA) dos contaminantes analisados no sedimento por Yamamoto et al., (2023b) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. Grupos químicos analisados no sedimento: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados/metaloides e piretróides. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

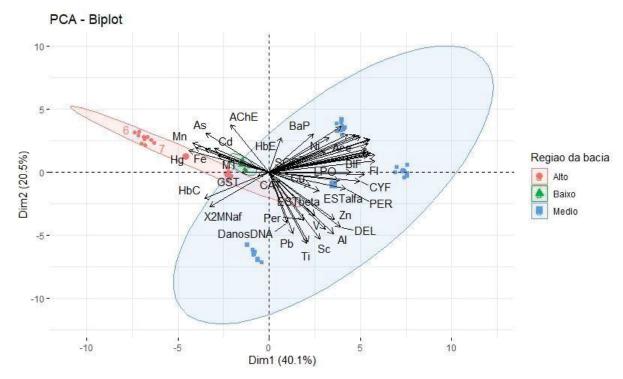


Figura 12. Análises de Componentes Principais (PCA) dos contaminantes analisados no sedimento por Yamamoto et al. (2023b) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. Grupos químicos analisados no sedimento: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados e piretróides. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da bacia do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares; Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal2.

A PCA para todos os contaminantes HPAs no sedimento e os biomarcadores (Fig. 13 e 14) explicou 47,3% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), seguido por 15,4% da variação dos dados para o segundo componente (Dim2), 11,24% para o terceiro componente e 8,51% para o quarto componente.

Foi possível distinguir três agrupamentos de contaminantes HPAs e biomarcadores. O primeiro foi o ponto NAQ que se agrupou aos contaminantes Fen, DBT, Pir, Fltr, BaP, Ant, BaA e Fl. O segundo foi o ponto GOV e contaminantes BbF, DahA, BghiP, Aci, IcdP, Cri e BkF, além de ter apresentado maiores níveis de peroxidação lipídica e aumento de atividade das esterases α, β e SOD. Por fim, o terceiro grupo com os pontos GUA, CAN, REF que se agruparam aos contaminantes X2MNaf, X1MNaf, Naf e os biomarcadores de expressão gênica de HbC, MT e das atividades enzimáticas de AChE e CAT, e do ponto AIM a atividade enzimática de GST (Tabs S3 e S4).

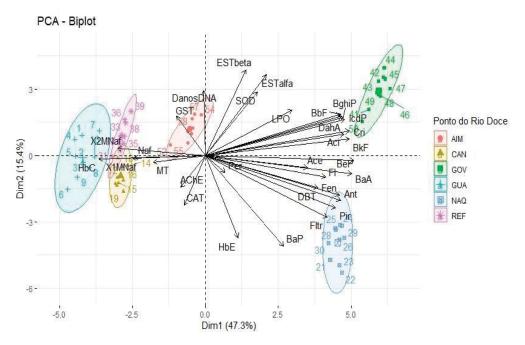


Figura 13. Análises de Componentes Principais (PCA) dos Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados no sedimento por Yamamoto et al. (2023b) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AchE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneina. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

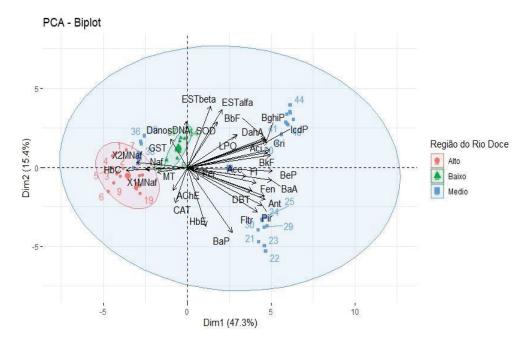


Figura 14. Análises de Componentes Principais (PCA) dos Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados no sedimento por Yamamoto et al. 2023 e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE= acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneina. Região da bacia do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

A PCA para todos os metais no sedimento e os biomarcadores (Fig. 15 e 16) explicou 37,3% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), seguido por 17,6% da variação dos dados para o segundo componente (Dim2), 12,6% para o terceiro componente e 10,6% para o quarto componente.

Assim como para os HPAs, a PCA dos metais com os pontos de coleta se particionou em três agrupamentos de contaminantes e biomarcadores. O primeiro foi o ponto GUA com os metais As, Hg, Mn, Fe e Cd, e os biomarcadores MT e GST que apresentaram os maiores níveis neste ponto. O segundo foi o agrupamento dos pontos REF e GOV com os metais Al, Cu, Cr, Pb, Zn, Ti, Sc e V e os biomarcadores esterases, SOD, LPO e Danos em DNA. O terceiro grupo com os pontos CAN, NAQ e AIM relacionados ao metal Ni e a expressão gênica de HbE (Tabs. S5 e S6).

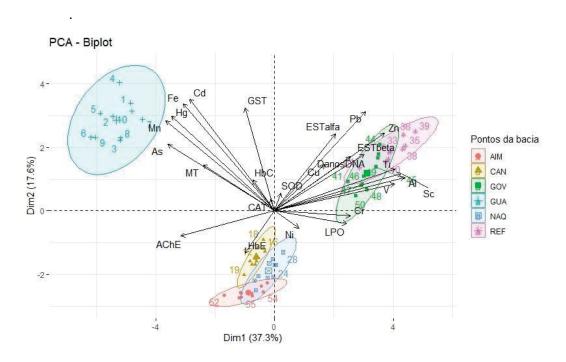


Figura 15. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais pesados e metaloides analisados no sedimento por Yamamoto et al. (2023b) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

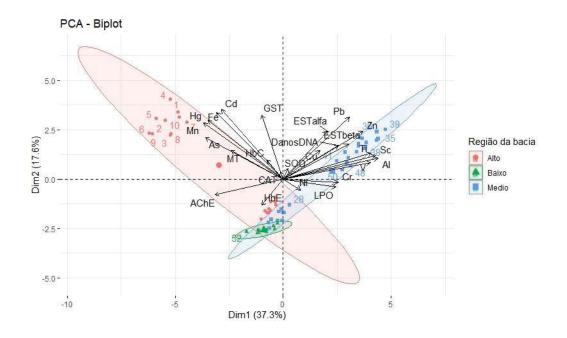


Figura 16. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais pesados analisados no sedimento por Yamamoto et al. 2023a e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da bacia do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

A PCA para os piretróides no sedimento e os biomarcadores (Fig. 17 e 18) explicou 34,4% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), seguido por 16,3% da variação dos dados para o segundo componente (Dim2) e 12,12% para o terceiro componente.

Foi possível observar que o ponto GOV foi o mais influenciado pelos cinco piretroides, sendo o ponto com os maiores níveis de CYF e BIF (Tabs. S7 e S8).

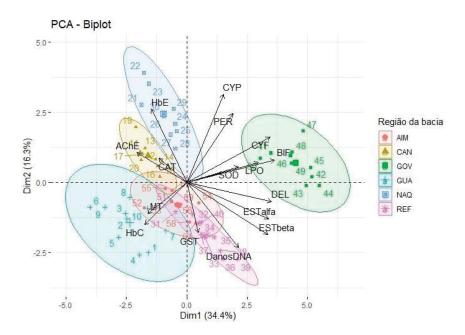


Figura 17. Análises de Componentes Principais (PCA) dos piretroides analisados no sedimento por Yamamoto et al. (2023b) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

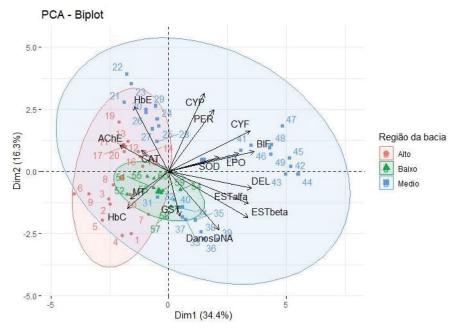


Figura 18. Análises de Componentes Principais (PCA) dos piretroides analisados no sedimento por Yamamoto et al. (2023b) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S-Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da bacia do Rio Doce em que o sedimento foi coletado:Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

A PCA para a concentração de metais (ver cap. I) nas larvas e os biomarcadores explicou 35,4% da variação dos dados no primeiro componenteprincipal (Dim1), seguido por 20,2% da variação dos dados para o segundo componente (Dim2), 11,69% para o terceiro componente e 11,24% para o quarto componente.

Os maiores níveis de concentração de metais pesados nas larvas estão nos pontos do alto Rio Doce, exceto Pb no ponto NAQ do médio Rio Doce (Fig. 19 e 20; Tabs. S9 e S10).

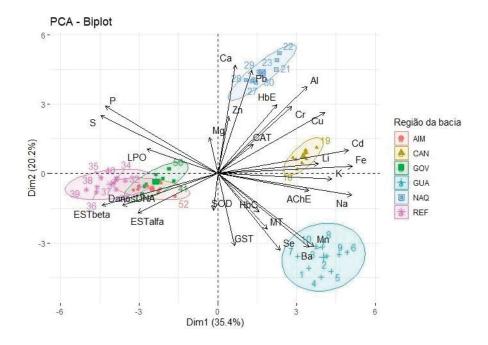


Figura 19. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais concentrados nas larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce ao longo de oito dias (ver Cap. I) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S- Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E.MT = Metalotioneína. Sedimentos de exposição: Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN), Naque (NAQ), Referência (REF), Governador Valadares (GOV), Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

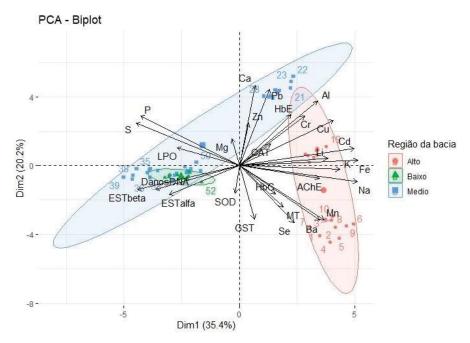


Figura 20. Análises de Componentes Principais (PCA) dos metais concentrados nas larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce ao longo de oito dias (ver Cap. I) e os biomarcadores bioquímicos e genéticos. AChE = acetilcolinesterase. GST = Glutationa S- Transferase. EST alfa =  $\alpha$ -Esterase. EST beta =  $\beta$ -esterase. SOD = Superóxido dismutase. CAT = Catalase. LPO = Peroxidação lipídica. Danos em DNA. HbC = Hemoglobina C. HbE = Hemoglobina E. MT = Metalotioneína. Região da Bacia do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte e UHE Candonga. Médio = Naque, Referência e Governador Valadares. Baixo = Aimorés. Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2

A análise de correlação indica correlação inversa entre a presença de Al, Cd, Cr, Cu, Fe K, Li na atividade das esterases, e a correlação entre estes mesmo metais com a expressão gênica de HbE (Fig. 21).

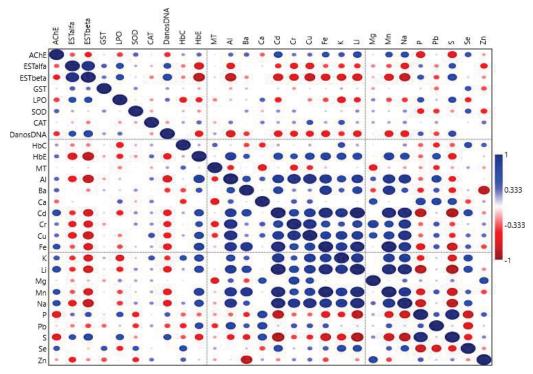


Figura 21. Análise de correlação entre os biomarcadores e os metais bioconcentrados nas larvas.

A PCA da composição físico-química do sedimento encontrado nos diferentes pontos ao longo da bacia do Rio Doce em relação a frequência de alterações histológicas (Fig.22) explicou 39,3% da variação dos dados no primeiro componente principal (Dim1), seguido por 24,0% da variação dos dados para o segundo componente (Dim2).

Foi possível observar que a maior frquência de alterações histológicas se concentrou nos pontos do médio Rio Doce (NAQ, REF e GOV) onde ocorreu o agrupamento da maioria dos contaminantes químicos orgânicos e a presença de diversos metais. A presença de grânulos no intestino ocorreu em maior frequência no ponto REF onde há maior nível de matéria orgânica e areia muito fina. Em contrapartida o acúmulo de sedimento no citoplasma das células e grânulos nos túbulos de Malpighi ocorreram em maior frequência no ponto NAQ. A presença de váculos nas células do corpo gorduroso ocorrreu majoritarianete em larvas expostas aos sedimentos de REF e GOV (Tabs. S11 e S12).

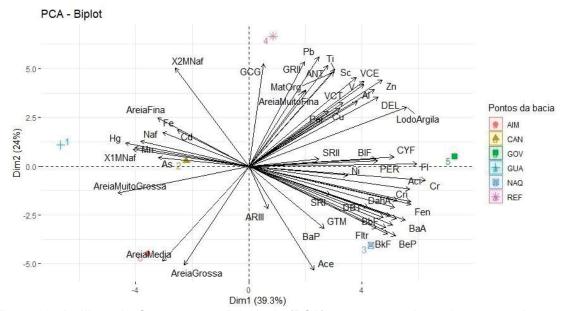


Figura 22. Análises de Componentes Principais (PCA) entre a granulometria e contaminantes químicos (metais, metaloides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e piretroides) dos sedimentos da bacia do Rio Doce (Yamamoto et.al., 2023b) que foram utilizados nos bioensaios de exposição subcrônica em larvas de Chironomus sancticaroli e a frequência de alterações histológicas analisadas. LodoArgila = lodo e argila <63 μm; AreiaMuitoFina = areia muito fina 63-125 μm; AreiaFina = areia fina 125-250 μm; AreiaMedia = areia média 250-500 μm; AreiaGrossa = areia grossa 0.5-1 mm; AreiaMuitoGrossa = areia muito grossa >1 mm; MatOrg = matéria orgânica. GCG = grânulos no ceco gástrico; GRII = grânulos na região II do mesêntero; SRI = sedimento na região II do mesêntero; ARIII = alteração na região III do mesêntero; VCT = vacúolo citoplasmático no trofócito; VCE = vacúolo citoplasmático no enócito; ANT = alteração no núcleo do trofócito; GTM = grânulos no Túbulo de Malpighi. Região da bacia do Rio Doce em que o sedimento foi coletado: Alto = Gualaxo do Norte (GUA), UHE Candonga (CAN); Médio = Naque (NAQ), Referência (REF) e Governador Valadares (GOV); Baixo = Aimorés (AIM). Dim 1 = componente principal 1. Dim 2 = componente principal 2.

#### 4. DISCUSSÃO

Os dados evidenciaram a partir do índice integrado de biomarcadores que as larvas expostas aos sedimentos do médio Rio Doce foram as que sofreram maiores scores de alterações nos biomarcadores, influenciadas por uma mistura complexa de contaminantes inorgânicos e orgânicos. Os resultados indicam que as alterações nas enzimas de biotransfomação foram mais significativas nos pontos do médio Rio Doce e o aumento das expressões gênicas nos pontos do alto Rio Doce.

As análises multivariadas evidenciaram que o alto Rio Doce foi influenciado por uma gama de metais no sedimento como Mn, Cd, Hg, Fe e As e as larvas expostas aos sedimentos bioconcentraram alguns desses metais como Ba, Li, Cd, Cu, Mn e Se, sendo possível indicar que o alto Rio Doce é influenciado por diversos metais que alcançam as larvas provavelmente determinando alterações na expressão gênica das isoformas de

hemoglobinas e na metalotioneína.

O aumento da expressão gênica de HbE nos pontos mais próximos às atividades de extração, transporte e processamento de minérios no Quadrilátero Ferrífero e Vale do Aço pode estar relacionado a presença elevada de metais neste segmento do rio (Yamamoto et al., 2022b). Nath (2018) mostra correlação positiva entre o aumento da presença de ferro (na dieta) e a elevação dos níveis de hemoglobina na hemolinfa larval. Além disso, o aumento na quantidade de hemoglobinas pode estar relacionado a suplementação de oxigênio, importante para reações metabólicas de geração de ATP e detoxificação (Osmulski & Leyko, 1986).

A metalotioneína também apresentou os maiores níveis de expressão no ponto GUA, no alto Rio Doce. Este aumento da expressão da metalotioneína em chironomideos expostos a metais também foi observado por Gillis et al. (2002), Duran et al. (2012), Park and Kwak (2012), Arambourou et al. (2013), Jeppe et al. (2014), Long et al. (2015) e Somparn et al. (2015). Weber et al. (2020) também observaram o aumento metalotioneína, em peixes expostos aos contaminantes em área afetada pelo rompimento da barragem no alto Rio Doce. Metalotioneínas são importantes para regulação da concentração de metais como Cd, Cu, Cr e Zn (Egli et al., 2006; Slobodian et al., 2021; Purać et al., 2021), na célula, atuando como quelantes destes elementos (Luo et al., 2020), podendo indicar um possível mecanismo de detoxificação das larvas frente a diversidade de metais presentes neste segmento do rio.

Além do aumento na expressão gênica das hemoglobinas, as larvas expostas aos sedimentos de CAN apresentaram alterações em diferentes mecanismos de detoxificação como na inibição de enzimas de biotranfomação (GST), e neurotoxicidade (AChE), e a indução da atividade de enzima antioxidante (CAT). Alterações em outras enzimas com os mesmos mecanismos foram observadas por Weber et al. (2020) nas enzimas P450, SOD e CAT e Macêdo et al. (2020) na enzima antioxidante HSP70 no ponto mais próximo ao rompimento da barragem, e desordem na sódio-potássio ATPase em órgãos de peixes influenciados por diferentes metais. Entre os danos, Yamamoto et al. (2022a) observaram deformidades significativas em embriões de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) e quabras de fita(s) do DNA ("single or double strand breaks"), principalmente para o ponto GUA. Gomes et al. (2018) analisando peixes expostos a contaminação ambiental em Mariana, MG (alto Rio Doce) encontraram micronúcleos e anomalias nucleares em eritrócitos relacionados à presença de metais.

A abundância de metais no alto Rio Doce, está associada à intensa exploração de

ouro e ferro na região do Quadriláfero ferrífero ao longo dos últimos 300 anos (Costa et al., 2003; Castro et al., 2011; Cavalcanti et al., 2021). Além deste cenário pré-existente de contaminação crônica, em 2015 houve o rompimento da barragem do Fundão com 40 milhões de metros cúbicos de rejeitos da extração de minérios de ferro, que foi transportado mesmo que residualmente ao longo da bacia, percorrendo todo o percurso principal do Rio Doce, ocasionando a ressuspensão dos sedimentos e distribuição de contaminantes até a sua foz e região litorânea no Espírito Santo. Por isso a presença de metais também foi observada nos outros segmentos do rio analisados por Yamamoto et al. (2023b).

No médio Rio Doce além dos impactos de contaminantes inorgânicos, as análises multivariadas mostraram forte influência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e inseticidas piretróides principalmente nos pontos NAQ e GOV. Os pontos analisados no médio Rio Doce estão situados em região onde há a presença de indústrias siderúrgicas e metalúrgicas e centros urbanos, sendo a maioria sem uma rede de tratamento de esgoto adequada (Consórcio ECOPLAN-LUME, 2010). Esses efluentes provavelmente introduzem metais, como AI, Cr, Pb, Sc, V, Ti, Zn detectados neste segmento do rio (Yamamoto et al., 2023b), além dos contaminantes orgânicos. Esta mistura complexa influenciou principalmente alterações nas enzimas de biotransformação de compostos orgânicos com o aumento da atividade das esterases, inibição de GST em NAQ, alterações em enzimas antioxidantes como SOD, peroxidação lipídica no ponto GOV e neurotoxicidade.

O aumento da atividade das esterases nas larvas expostas aos três pontos do médio Rio Doce e inibição de GST em NAQ, pontos influenciados por HPAs e piretroides, indica grande influência desses contaminantes orgânicos, já que as atividades das esterases estão relacionadas a biotransformação de fase I de compostos orgânicos a partir da hidrólise dessas moléculas, e atuam na resistência a diferentes inseticidas (Li et al., 2009; Montella et al., 2012) e GST na biotransformação de fase II, catalisando a conjugação de compostos eletrofílicos para facilitar a excreção, protegendo-os de danos químicos (Vos & Bladeren 1990).

A inibição de GST ocasionada em chíronomideos expostos principalmente a compostos orgânicos e com misturas já foi observado após a exposição ao paration (Printes et al., 2007), em sedimentos contaminados com pesticidas (Printes et al., 2011), ou sedimentos de um lago (Qi et al., 2015), assim como outros pesticidas como clorantraniliprole (Rodrigues et al., 2015), Benzil butil ftalato (Herrero et al., 2015; Morais

et al., 2020), Fipronil (Monteiro et al., 2019b), Bifentrina (Ballesteros et al., 2020) e fenantreno (Rebechi et al., 2021). Entretanto, outros trabalhos já apontaram a indução desses orgânicos na GST (Lee & Choi, 2006; Park et al., 2009; Somparn et al., 2017; Vicentini et al., 2017; Monteiro et al., 2019a; Xie et al., 2020; Duran et al., 2012; Planelló et al., 2015). Além disso contaminantes inorgânicos também podem influenciar nesta enzima (Nair & Choi, 2011; Jeppe et al., 2014; Kim et al., 2015; Tokhun et al., 2017; Morais et al., 2019; Xie et al., 2020).

A inibição de AChE em larvas de chironomideos expostas aos pontos do médio e alto Rio Doce com diferentes compostos também é corroborada com estudos da literatura (Kheir et al., 2001; Printes et al., 2007; Duran et al., 2012; Qi et al., 2015; Vicentini et al., 2017; Morais et al., 2020) principalmente relacionada com compostos orgânicos como inseticidas (Sturm & Hansen, 1999; Beauvais et al., 1999; Fisher et al., 2000; Callaghan et al., 2001; Crane et al., 2002; Callaghan et al., 2002; Choi et al., 2002; Maycock et al., 2003; Forcella et al., 2007; Domingues et al., 2007; Azevedo-Pereira et al., 2011; Van Praet et al., 2014; Rebechi et al., 2014; Somparn et al., 2017; Ishimota et al., 2020; Rebechi et al., 2021). Esta enzima atua na catálise da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica para que a sinalização seja concluída. A inibição desta enzima causa neurotoxicidade por superexcitação, e caso não possa ser revertida, pode ocasionar a mortalidade.

A co-ocorrência de contaminantes nos pontos do médio Rio Doce pode ser um indicativo do resultado obtido pelo IBR, apresentando os pontos deste segmento do rio como aqueles com maior acúmulo de alterações dos efeitos subletais. Isto evidencia que a estas misturas de contaminantes induzem mecanismos diversos de detoxificação, ainda assim, nos chironomideos estes mecanismos não demonstraram prevenir a ocorrência de potenciais efeitos neurotóxicos e danos nas membranas. Yamamoto et al. (2022a) observaram que os pontos do alto Rio Doce (GUA e CAN) foram os que apresentaram os maiores índices na integração dos biomarcadores em embriões de peixes, diferente da resposta encontrada na presente pesquisa que indicou maior índice nos pontos do médio Rio Doce. Isto pode estar relacionado com a diferença metodológica, principalmente com relação ao organismo estudado, já que os embriões estiveram expostos principalmente aos contaminantes mais biodisponíveis na água enquanto as larvas com maior contato aos dos sedimentos, bem como as diferentes vias de exposição aos contaminantes e mecanismos espécie-específicos desencadeados. É também possível que os chironomídeos apresentaram maior sensibilidade aos

contaminantes associados à matéria orgânica, já que os pontos do médio Rio Doce são os que apresentaram maior concentração de MO e onde foram observadas mais alterações nas respostas dos biomarcadores.

É possível que a baixa incidência de alterações nas atividades enzimáticas no ponto AIM, localizado do baixo Rio Doce, esteja relacionada também a uma menor associação de contaminantes a MO neste local. Este segmento do rio se encontra mais distante de grandes centros urbanos como Governador Valadares em Minas Gerais e Colatina e Linhares no Espírito Santo, porém apresenta agricultura e pecuária (Consórcio ECOPLAN-LUME, 2010), ainda assim podendo ser impactado pela presença de contaminantes orgânicos e metais advindos a montante do rio e possivelmente de agroquímicos. A influência negativa da presença de metais no baixo Rio Doce foi observada para outros organismos. Em peixes Prochilodus lineatus coletados no baixo Rio Doce, Vieira et al. (2022) observaram correlações entre a presença de metais com danos em proteínas, DNA e peroxidação lipídica, além da indução da metalotioneína, CAT e SOD e de enzimas relacionadas ao metabolismo energético (LDH e MDH), associados a danos histológicos. Merçon et al. (2022) observaram aumento da atividade de CAT e GST em diferentes órgãos de peixes expostos a metais, neste mesmo segmento do rio. Yamamoto et al. (2022a, 2023b) observaram danos em DNA em embriões de Rhamdia quelen e peroxidação lipídica em peixes de AIM.

A influência de metais na foz do rio e na costa atlântica também afetou camarões marinhos observada pela forte associação entre a presença de Fe e aumento de metalotioneína, e presença de Cd, Cr, Cu e Mn nos tecidos, biodisponibilidade, peroxidação lipídica durante o período seco do ano (Maraschi et al., 2022). Para o plancton foi detectada influência de metais, principalmente Fe, Mn e Cd na peroxidação lipídica e indução de metalotioneínas (Marques et al., 2022). Frossard et al. (2020) analisando filhotes de Chelonia mydas na ilha de Trindade próximo a desembocadura do rio no mar, encontraram micronúcleos e anomalias nucleares em eritrócitos relacionados a presença de metais. Em corais presentes na costa adjacente a região em que o Rio Doce desagua no Oceano Atlântico, Dal Pizzol et al. (2022) observaram uma indução da reposta antioxidante nestes organismos e baixos níveis de peroxidação lípidica na presença de Fe e As, entretanto a inibição de anidrase carbônica esteve relacionada à presença de Mn, Cr e As. Em peixes estuarinos de diferentes níveis tróficos, Bevitório et al. (2022) observaram alteração na atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT), inversamente relacionadas a peroxidação lipídica, danos em DNA e indução de

metalotioneína; aumento das enzimas relacionadas ao metabolismo energético (MDH e LDH) relacionados com o maior custo energético para manter a homeostase e danos morfológicos, relacionados a bioacumulação de diferentes metais (Mn, Zn, Cd, Cr e Cu). Isto indica que a grande diversidade de metais parece influenciar grande parte da bacia hidrográfica do Rio Doce, assim como a costa adjacente a desembocadura.

As larvas expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce apresentaram ainda, alterações histopatológicas principalmente relacionadas ao sistema digestório e corpo gorduroso.

No sistema digestório houve alterações nas larvas expostas ao sedimento de todos os pontos coletados na bacia do Rio Doce, mas apenas no intestino médio (ceco gástrico, regiões I, II e III). Essas alterações foram principalmente com a presença de sedimento no interior das células.

Para muitos insetos os cecos gástricos possuem função de absorção de nutrientes (Chapman, 2012), porém, em chironomideos foi observada função de síntese e secreção (Seidman et al., 1986; Belowitz & O'Donnell, 2013). A presente pesquisa observou grânulos na região basal das células de larvas expostas ao sedimento do ponto REF, o que pode indicar fluxo de metais nesta região do intestino. A presença de fluxo de metais também foi observada em *Chironomus riparius* (Leonard et al., 2018). Este ponto apresenta majoritariamente tamanhos de partículas menores no sedimento, principalmente lodo e argila e os maiores níveis de matéria orgânica, além da presença de metais como Pb, Ti, Sc, V, Al e Cu (Yamamoto et al., 2023). Os resultados de Grueso-Gilaberth et al. (2020) foram similares aos obtidos nesta investigação, com alteração nos cecos gástricos em *Polypedilum sp*. (Chironomidae — Diptera) expostos a ambiente contaminado por resíduos de mineração como metais indicando que essas partículas sedimentares influenciam esta região do sistema digestório.

Na região I do intestino médio houve a presença de resíduos de sedimento no citoplasma das células em larvas expostas ao sedimento de todos os pontos, sendo em maior frequência no ponto NAQ, que possui na sua composição química influenciada por metais e contaminantes orgânicos (Yamamoto et al., 2023b). A região I do intestino médio possui função de atividade secretora, transporte ativo de íons e fluídos, não relacionado à absorção de nutrientes (Pierson, 1956; Seidman et al., 1986). Portanto, pode-se sugerir que a entrada de resíduos de sedimento, composto por metais eletricamente carregados, e presentes no citoplasma das células pode ocorrer atráves do sistema de transporte ativo de íons. Este sistema transporta íons essenciais para

dentro do organismo, entretanto metais tóxicos também podem ser transportados pela semelhança nas cargas elétricas (Belowitz & O'Donnell, 2013, Leonard et al., 2018). Acúmulo e fluxo de metais na região anterior do intestino médio foi observado por Seidman et al. (1986), Belowitz & O'Donnell (2013) e Leonard et al. (2018), corroborando com a nossa hipótese da presença desses resíduos.

Para a região I do intestino Richardi et al. (2018) observaram redução do lúmen do intestino em larvas da mesma espécie, expostas ao fenantreno, enquanto Signorini-Souza et al. (2020) observaram a redução do lúmen e alteração na morfologia na região apical das células desta região em larvas expostas a éteres difenílicos polibromados. Vacuolização do citoplasma em células da região I do intestino foram observadas em *Polypedilum sp.* exposta a contaminantes de mineração (Grueso-Gilaberth et al., 2020), em *Chironomus calligraphus* expostos ao piretroide cipermetrina (Lavarías et al., 2017) e em *Chironomus riparius* exposto a nanoparticulas de óxido de ferro (Stojanovic et al., 2021). Na presente pesquisa não foi observada diferença de vacuolização nessas células em relação ao controle, apesar da complexicidade de xenobióticos presentes no sedimento.

A região II do intestino médio tem por função a absorção de nutrientes (Pierson, 1956), síntese proteica e reserva de glicogênio (Seidman et al., 1986). Neste segmento do intestino foi obsevado a presença de grânulos de sedimento ao longo da borda basal das células em larvas expostas ao sedimento de todos os pontos analisados, exceto AIM no qual não foi observado nenhum grânulo. Além disso, foi observado resíduos de sedimento no citoplasma das células epiteliais do intestino nas larvas expostas ao sedimento de CAN, NAQ e REF. Assim como na presente pesquisa, Seidman et al. (1986) para *Chironomus thummi* e Sumi et al. (1984) para *Chironomus yoshimatsui* observaram grânulos ligados à membrana e resíduos do metal pesado cadmio nas células deste segmento do intestino. Belowitz & O'Donnell (2013) e Leonard et al. (2018) observaram o fluxo de diferentes metais nesta região, indicando que assim como para a região I do intestino médio, a alta troca iônica nesta região pode ter favorecido a entrada dessas partículas de sedimentos, provavelmente associadas aos metais, nas células intestinais.

Quando estes metais não essenciais são absorvidos para dentro do organismo, a ativação de mecanismos de detoxificação é requerido, como o aumento do efluxo dessas moléculas para fora do organismo (Belowitz & O'Donnell, 2013). O aumento do efluxo pode ocorrer pela excreção do metal através do transporte dessas moléculas pelo epitélio

do intestino ou dos túbulos de Malpighi (O'Donnell, 2008; Leonard et al., 2009; Belowitz & O'Donnell, 2013; Leonard et al., 2018). A desintoxicação pode envolver o sequestro, principalmente de metais divalentes não essenciais, com a formação de grânulos insolúveis ou concreções dentro das células de órgãos envolvidos na digestão, armazenamento, regulação de íons e excreção (Brown, 1982; Seidman et al., 1986; Krantzberg e Stokes, 1990; Zheng et al., 2017), ou tornar o metal inerte por meio da ligação a proteínas, como a metalotioneína, importantes na regulação e detoxificação intracelular (Hamilton & Mehrle, 1986; Gimbert et al., 2016). Diferente das demais regiões do intestino, a região III do intestino médio apresentou apenas alterações na morfologia, com o estreitamento das células de larvas expostas aos sedimentos de CAN, GOV e AIM. Nesta região há presença de grande quantidade de microvilosidades e secreção de enzimas digestivas indicando ser a principal região de absorção de cátions, bem como de açúcares, gorduras e proteínas de pequeno peso molecular, que ocorre por processos passivos ou ativos (Pierson, 1956; Krantzberg & Stokes, 1990; Richardi et al., 2015).

Nessas três regiões que compõem o intestino médio, há presença de uma matriz peritrófica, que protege as células do intestino médio de danos mecânicos e químicos. O tamanho dos poros da matriz peritórica diminui em direção ao intestino posterior e permite que pequenas moléculas passem através ou penetrem nas das células do intestino médio (Stojanovic et al., 2021). Portanto, não representa uma barreira para nanopartículas (Holtof et al., 2019). Com base na frequência de detecção de alterações histológicas nas larvas, o intestino médio foi um local importante para o acúmulo de partículas em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas a sedimentos com a presença de diversos metais.

Além do sistema digestório, os túbulos de Malpighi das larvas expostas ao sedimento do ponto NAQ também apresentaram resíduos de sedimento nas células epiteliais. Sumi et al. (1984), Seidman et al. (1986), Krantzberg & Stokes (1990) e Zheng et al. (2017) também constataram acúmulo de metais principalmente no epitélio do intestino e nos túbulos de Malpighi. Este acúmulo pode estar relacionado ao sistema de detoxificação do organismo com a formação de grânulos e o efluxo desses metais pelo sistema digestório e de trocas iônicas como os túbulos de Malpighi.

A exposição subcrônica ocasionou ainda danos nas células do corpo gorduroso de larvas expostas aos sedimentos de todos os pontos coletados ao longo da bacia. Estas alterações estão relacionadas com a presença de vacúolos em enócitos e trofócitos,

aumento do tamanho de trofócitos e alterações nucleares nestas células.

O corpo gorduroso está distribuído entre a epiderme e os músculos intersegmentais e entre os órgãos sendo as células constituintes separadas entre trofócitos e enócitos (Richardi et al., 2015). As células mais numerosas são os trofócitos, onde os parietais em *Chironomus thummi* apresentaram relação com a produção de hemoglobinas (Schin et al., 1977; Vafopoulou-Mandalos & Lauder 1984) e em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster* envolvidos em processos de detoxificação (Lycett et al., 2006; Chung et al., 2009). Já os trofócitos viscerais demonstraram relação com o metabolismo energético e processos de desintoxicação (Cruz-Landim, 2009). Os enócitos estão dispersos entre o corpo gorduroso parietal, em pequenos grupos ou isolados. As células que ocorrem em grupo são grandes e globulares devido a presença de citoplasma perinuclear basófilo, e podem estar relacionadas com a síntese proteica (Richardi et al., 2018). As células isoladas podem estar relacionadas com a síntese de ácidos graxos e hidrocarbonetos para a cutícula (Cruz-Landim, 2009; Makki et al., 2014) ou armazenamento de hemoglobina (Schin et al., 1977).

As alterações encontradas nas larvas submetidas ao sedimento do Rio Doce envolvendo trofócitos e enócitos podem ser justificadas por três hipóteses: lipofilicidade de contaminantes orgânicos, efeitos do metabolismo envolvendo processos de detoxificação e efeitos do metabolismo para o desenvolvimento em pupa. A vacuolização das células em *C. sancticaroli* foi observada tanto em trofócitos (Richardi et al., 2018) quanto em enócitos (Signorini-Souza et al., 2020) de larvas expostas ao hidrocarboneto policíclico aromático fenantreno e a éteres difenil polibromados. Uma das características em comum desses compostos com aqueles orgânicos (principalmente HPAs) analisados por Yamamoto et al. (2023b) nos pontos de coleta dos sedimentos utilizados na presente pesquisa, é a lipofilicidade destes contaminantes e a afinidade por estruturas ricas em lipídios dentro dos organismos (Atsdr, 2004; Jesus et al., 2022), que podem gerar bioacumulação e danos. As alterações envolvendo o corpo gorduroso estiveram em maior quantidade nos pontos do médio Rio Doce, pontos estes que estiveram fortemente correlacionados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados em maior quantidade nestes pontos da bacia (Yamamoto et al., 2023b)

A segunda hipótese sugere que a exposição das larvas aos sedimentos contendo uma ampla gama de contaminantes pode ter desencadeado o aumento do metabolismo energético nas células do corpo gorduroso responsáveis pela secreção, armazenamento e desintoxicação de substâncias orgânicas presentes no corpo do inseto ocasionando o

aumento da vacuolização e alterações nucleares (Skowronek et al., 2021). Silva et al., (2017) observaram a presença de vacúolos autofágicos associados a depósitos de lipofuscina que resultam da degeneração mitocondrial, em maior proporção do que no controle, dentro das células do corpo adiposo em *Spodoptera frugiperda* exposta a óleo.

A relação de alterações no corpo gorduroso de chironomideos e a exposição a diferentes contaminantes orgânicos e inorgânicos foi observado em diversos trabalhos. Sumi et al. (1984) e Seidman et al. (1986) observaram associação de Cd ao corpo gorduroso em *C. yoshimatsui* e *C. riparius*. Lavarías et al. (2017) observaram aumento na quantidade de células no corpo gorduroso de *C. calligraphus* exposto ao piretróide cipermetrina. Richardi et al. (2018) observaram alteração nucleares trofócitos de larvas de *C. sancticaroli* expostas ao fenantreno. Grueso-Gilaberth et al. (2020) observaram perda nuclear e ruptura dos enócitos, vacuolização dos trofócitos viscerais e parietais de *Polypedilum sp.* expostas a contaminantes de mineração. Stojanovic et al. (2021) observaram espaços intercelulares nas células do corpo gorduroso em larvas de *C. riparius* expostas a nanopartículas de TiO2, vacúolos no citoplasma e pequenos núcleos nas células expostas a nanopartículas de Fe3O4 e CeO2.

A última hipótese está relacionada com a função fundamental de armazenamento que o corpo gorduroso possui nos insetos holometábolos. Durante os estágios larvais em que estes organismos se alimentam, reservas de energia são acumuladas para serem utilizadas durante a metamorfose provendo energia para o novo adulto (Arrese & Soulages, 2010). A variedade de capacidades sintéticas do corpo gorduroso é igualada por uma variedade igual de compartimentos ou vacúolos derivados do sistema vacuolar. O corpo gorduroso tem pelo menos 11 especializações de compartimentos específicos da região pós-transição e duas ou três na região pré-transição (Locke, 1984). A presença desses vácuolos em larvas expostas aos sedimentos de todos os pontos ao longo da bacia, e ausência no controle pode sugerir, portanto, que as larvas poderiam estar próximas da metamorfose em pupa.

Apesar da realização de diversos estudos dos impactos da poluição na bacia, poucos trabalhos consideram a co-exposição dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes no Rio Doce (Yamamoto et al., 2022b, 2023b). Os resultados gerados no presente estudo demonstraram a importância desta análise para uma interpretação adequada das alterações das respostas de biomarcadores em organismos expostos a múltiplos contaminantes presentes nos sedimentos do Rio Doce. Igualmente há número reduzido de publicações analisando o impacto desses multiplos contaminantes sobre

invertebrados de águas continentais, considerando todos os trechos do rio, este representa o primeiro trabalho com chironomideos expostos aos contaminantes da bacia do Rio Doce utilizando sedimentos que receberam volume expecionalmente elevado de resíduos de rejeitos de mineração em único evento.

A exposição das larvas a estes rejeitos, evidenciaram o efeito nos tecidos provocados pela presença física dessas partículas de sedimento intracelularmente. Além disso, associados às substâncias liberadas pelas áreas urbanas e industrias ao longo da bacia do Rio Doce podem ter comprometido o funcionamento ideal da maquinaria dos processos genéticos e fisiológicos do organismo para que essas alterações pudessem ser evitadas.

## 5. CONCLUSÕES

A exposição subcrônica aos sedimentos provenientes da bacia do Rio Doce, principalmente naqueles localizados no médio Rio Doce, causaram os maiores scores de alterações dos biomarcadores em larvas de C. sancticaroli. Este segmento do rio é influenciado por contaminantes orgânicos introduzidos por diferentes atividades antrópicas como industrias e a presença de centros urbanos, além da presença de metais, encontrados ao longo de toda a bacia. Os dados informam que a avaliação de toxidade de sedimentos com a utilização de organismo bentônico e o IBR é necessária e relevante na interpretação de biomarcadores em sedimentos com composição complexa. As análises multivariadas mostraram forte associação entre os biomarcadores de biotransformação de compostos orgânicos nos pontos localizados no médio Rio Doce, enquanto a expressão gênica das hemoglobinas e metalotioneína apresentaram os maiores níveis nos pontos do alto Rio Doce, associadas principalmente com a atividade histórica de mineração na região ao longo do tempo. O principal efeito histopatólogico observado nas larvas de Chironomus sancticaroli expostas aos sedimentos da bacia do Rio Doce foi a presença de grânulos do sedimento, nas células do intestino médio. A diversidade particulada dos sedimentos utilizados na presente pesquisa, com a presença de grande diversidade de metais e metaloides podem explicar estas alterações pelo efluxo de íons carreados pelas proteínas das células. Estes metais estão distribuídos ao longo de toda a bacia do Rio Doce provenientes da composição natural do solo e da intensa atividade de extração de minérios na região, em especial pelo rompimento da

barragem do Fundão, onde milhões de metros cúbicos de rejeitos foram carreados ao longo do rio ocasionando o revolvimento desse sedimento. Essas alterações do sistema digestório e as alterações nas células do corpo gorduroso em maior frequência nos pontos do médio Rio Doce, podem indicar que a complexicidade química dos sedimentos neste segmento do rio, com presença de contaminantes inorgânicos e orgânicos, que parecem potencializar os efeitos nas células causando múltiplos efeitos subletais que geraram alterações teciduais.

## REFERÊNCIAS

Adakole, J. A., Anunne, P. A. 2003. Benthic macroinvertebrates as indicators of environmental quality of an urban stream, Zaria, Northern Nigeria. Journal of Aquatic Sciences. 18(2): 85-92

Aebl, H. 1984. Catalase in vitro method. Enzymol., 105:121–126.

Ali, H.; Khan, E.; Ilahi, I. 2019. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. Journal of Chemistry, 2019: 1–14. doi:10.1155/2019/6730305

Allocati, N.; Masulli, M.; Di Ilio, C.; Federici, L. 2018. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. Oncogenesis. 7(8):1-15.

Amde, M.; Liu, J.; Tan, Z. Q.; Bekana, D. 2017. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. Env, Pollu., 230: 250–267. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.064

Arambourou, H.; Gismondi, E.; Branchu, P.; Beisel, J. N. 2013. Biochemical and morphological responses in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to lead-spiked sediment. Environ. Toxic. and Chem., n/a–n/a. doi:10.1002/etc.2336

Arambourou, H.; Planelló, R.; Llorente, L.; Fuertes, I.; Barata, C.; Delorme, N.; Noury, P.; Herrero, Ó.; Villeneuve, A.; Bonnineau, C. 2019. *Chironomus riparius* exposure tofield-collected contaminated sediments: From subcellular effect to whole-organism response. Sci. Total Environ, 671, 874–882.

Arrese, E. L.; Soulages, J. L. 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. Annual Review of Entomology, 55(1): 207–225. doi: 10.1146/annurev- ento-112408-085356

ATSDR, 2004. Toxicological Profile for Polybrominated Biphenyl and Polybrominated Diphenyl Ethers, Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia, pp. 1-564.

Azevedo-Pereira, H. M. V. S.; Lemos, M. F. L.; Soares, A. M. V. M. 2011. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. Ecotox. and Env. Saf., 74(5): 1210–1215. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.03.018

Azrina, M. Z.; Yap, C. K.; Rahim Ismail, A.; Ismail, A.; Tan, S. G. 2006. Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64(3): 337–347. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.04.003

Ballesteros, M. L.; Boyle, R. L.; Kellar, C. R.; Miglioranza, K. S. B.; Bistoni, M. A.; Pettigrove, V.; Long, S. M. 2020. What types of enzyme activities are useful biomarkersof bifenthrin exposure on *Chironomus sp.* (Diptera, Chironomidae) larvae underlaboratory

- and field-based microcosm conditions?. Aqu. Toxic., 228: 105618. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105618
- Beauvais, S. L.; Atchison, G. J.; Stenback, J. Z.; Crumpton, W. G. 1999. Use of cholinesterase activity to monitor exposure of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) to a pesticide mixture in hypoxic wetland mesocosms. Hydrobiologia, 416, 163–170. doi:10.1023/A:1003819621659
- Belek, N.; Erkmen, B.; Dinçel, A.S.; Gunal, A. C. 2022. Does persistent organic pollutant PFOS (perfluorooctane sulfonate) negative impacts on the aquatic invertebrate organism, Astacus leptodactylus [Eschscholtz, 1823]. Ecotoxicology 31: 1217–1230. doi:10.1007/s10646-022-02579-7
- Beliaeff, B.; Burgeout, T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Env. Toxic. and Chem. 21:1316–1322.
- Belowitz, R.; O'Donnell, M. J. 2013. Ion-selective microelectrode measurements of TI+ and K+ transport by the gut and associated epithelia in Chironomus riparius. Aquatic Toxicology, 138-139: 70–80. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.013
- Bergtrom, G.; Laufer, H.; Rogers, R. 1976. Fatbody: A site of hemoglobin synthesis in *Chironomus thummi* (Diptera). J. Cell Biol. 69: 264-274.
- Bevitório, L. Z.; da Silva, N. G.; Pirovani, J. C. M.; Marques, J. A.; Vieira, C. E. D.; Zebral, Y. D.; Damasceo, E. M.; Lopes, L. L. R.; SantAna, L. P.; Marube, L. C.; Costa, S. R.; Martins, C. M. G.; Sandrini, J. Z.; Souza, M. M.; Bianchini, A.; Vale-Oliveira, M.2022. Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. Mar. Pollu. Bull.. 177: 113511
- Bhavan, P. S.; Geraldine, P. 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn Macrobrachium malcolmsonii exposed to endosulfan. Aquatic Toxicology, 50(4): 331–339. doi:10.1016/s0166-445x(00)00096-5
- Borch, T.; Kretzschmar, R.; Kappler, A.; Cappellen, P. V.; Ginder-Vogel, M.; Voegelin, A.; Campbell, K. 2010. Biogeochemical Redox Processes and their Impact on Contaminant Dynamics. Env. Sci. & Tech., 44(1): 15–23. doi:10.1021/es9026248
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Bioch., 72(1-2): 248–254.
- Briegel, H.; Freyvogel, T. A.. 1971. Non-specific esterases during development of Culicine mosquitoes. Acta Trop., 28:291-297.
- Browder, M. H.; D'Amico, L. J.; Nijhout, H. F. 2001. The role of low levels of juvenile hormone esterase in the metamorphosis of *Manduca sexta*. J. Insect Sci., 1:11.
- Brown, B. E. 1982. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. Biological Reviews, 57(4): 621–667. doi:10.1111/j.1469-185x.1982.tb00375.x

Buell, M.-C.; Johannessen, C.; Drouillard, K.; & Metcalfe, C. 2020. Concentrations and source identification of PAHs, alkyl-PAHs and other organic contaminants in sediments from a contaminated harbor in the Laurentian Great Lakes. Environmental Pollution, 116058. doi:10.1016/j.envpol.2020.116058

Callaghan, A.; Hirthe, G.; Fisher, T.; Crane, M. 2001. Effect of Short-Term Exposure to Chlorpyrifos on Developmental Parameters and Biochemical Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. Ecotox. and Environ. Saf., 50(1): 19–24. doi:10.1006/eesa.2001.2071

Callaghan, A.; Fisher, T. C.; Grosso, A.; Holloway, G. J.; Crane, M. 2002. Effect of Temperature and Pirimiphos Methyl on Biochemical Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. Ecotox. and Environ. Saf., 52(2): 128–133. doi:10.1006/eesa.2002.2160

Canonica, S. (2007). Oxidation of Aquatic Organic Contaminants Induced by Excited Triplet States. CHIMIA International Journal for Chemistry, 61(10), 641–644. doi:10.2533/chimia.2007.641

Castro, P. T. A.; Nalini Jr, H. A.; Lima, H. M. 2011. Entendendo a mineração no Quadrilátero Ferrífero. Belo Horizonte: Ecológico, pp. 93.

Cavalcanti, J. A. D.; da Silva, M. S.; Schobbenhaus, C.; Lima, H. de M. 2021. Geo-Mining Heritages of the Mariana Anticline Region, Southeast of Quadrilátero Ferrífero-MG, Brazil: Qualitative and Quantitative Assessment of Chico Rei and Passagem Mines. Geoheritage 13, 98. doi:10.1007/s12371-021-00631-2

Chapman, P. U. 1989. Concepts and strategies for biological monitoring. London: GEMS/University of London. 45 p.

Chapman, R.F. 2012. The insects: structure and function. Cambridge University Press, New York. pp. 959

Chelvanayagam, G.; Parker, M. W.; Board, P. G. 2001. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. Chem-Biol Inter., 133(1-3): 256–260.

Chertemps, T.; François, A,; Durand, N.; Rosell, G.; Dekker, T.; Lucas, P.; Maibeche-Coisne, M. 2012. A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. BMC Biol. 10:56.

Chiang, M.W.-L.; Au, D.W.-T. 2013. Histopathological approaches in ecotoxicology. In: Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 597e614. doi:10.1007/978-94-007-5704-2 56.

Choi, J.; Roche, H. 2004. Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg (Diptera, Chironomidae) larvae: Potential biomarker of environmental biomonitoring. Environ. Monit. Assess. 92:229-239.

Choi, J.; Ha, M. H. 2009. Effect of cadmium exposure on the globin protein expressionin 4th instar larvae of *Chironomus riparius* Mg (Diptera: Chironomidae): an ecotoxicoproteomics approach. Proteomics 9:31-39

- Choi, J.; Roche, H.; Caquet, T. 1999. Characterization of superoxide dismutase activityin *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae a potential biomarker. Comp. Biochem. Physiol. C Pharm., Toxicol. and Endoc., 124(1): 73–81. doi:10.1016/s0742-8413(99)00045-6
- Choi, Y. K.; Jo, P. G.; Choi, C. Y. 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 147:286-292
- Chung, H.; Sztal, T.; Pasricha, S.; Sridhar, M.; Batterham, P.; Daborn, P. J. 2009. Characterization of Drosophila melanogaster cytochrome P450 genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 5731–5736
- Cobbett, C.; Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Ann. Rev. Plant Biol., 53:159-182.
- Consorcio Ecoplan-Lume, 2010a. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestãode recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce. Contrato Nº 043/2008 IGAM, Vol. 1, 2010. pp: 472. Disponível em: <www.cbhdoce.org.br>
- Costa, A. T.; Nalini, H. A.; de Lena, J. C.; Friese, K.; Mages, M. 2003. Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. Env. Geol., 45: 226–235. doi:10.1007/s00254-003-0870-6
- Crane, M.; Sildanchandra, W.; Kheir, R.; Callaghan, A. 2002. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. Ecotox. and Environ. Saf., 53(3): 361–369. doi:10.1016/s0147-6513(02)00038-6
- Crawford, S. E.; Brinkmann, M.; Ouellet, J. D.; Lehmkuhl, F.; Reicherter, K.; Schwarzbauer, J.; Bellanova, P.; Letmathe, P.; Blank, L. M.; Weber, R.; Crack, W.; Dongen, J. T.; Menzel, L.; Hecjer, M.; Schuttrumpf, H. Hollert, H. 2022. Remobilization of pollutants during extreme flood events poses severe risks to human and environmental health. J. of Haz. Mat., 421: 126691. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126691
- Cruz-Landim, C. 2009. Abelhas: Morfologia e Função dos Sistemas. 1ed. São Paulo: UNESP
- Dahan-Moss, Y. L; koekemoer, L. L. 2016. Analysis of esterase enzyme activity in adults of the major malaria vector *Anopheles funestus*. Paras. & Vect., 9:110.
- Dal Pizzol, J. L.; Marques, J. A.; Fonseca, J. S.; Costa, P. G.; Bianchini, A. 2022. Metal accumulation induces oxidative stress and alters carbonic anhydrase activity in coralsand symbionts from the largest reef complex in the South Atlantic ocean. Chemosphere. 290: 133216
- Dennis, I. A.; Coulthard, T. J.; Brewer, P.; Macklin, M. G. 2009. The role of floodplains in

- attenuating contaminated sediment fluxes in formerly mined drainage basins. EarthSurf. Process. Landf, 34: 453–466.
- Domingues, I.; Guilhermino, L.; Soares, A. M. V. M.; Nogueira, A. J. A. 2007. Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: Potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. Chemosphere, 69(1): 145–154. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.013
- Duarte, E. B.; Neves, M. A.; Benda de Oliveira, F.; Martins, M. E.; Rodrigues de Oliveira, C. H.; Burak, D. L.; Orlando, M. T. D.; Gabrig Turbay Range, C. V. 2020. Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. Chemosphere, 127879. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127879
- Duran, M.; Michailova, P.; Sari, A.; Ilkova, J.; Sen, A.; Karadurmus, E. 2012. Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). Acta Zool. Bulg. 64: 167–173.
- Eggleton, J.; Thomas, K. V. 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. Environ. Inter., 30(7): 973–980. doi:10.1016/j.envint.2004.03.001
- Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A.,... Schaffner, W. (2006). A Family Knockout of All Four Drosophila Metallothioneins Reveals a Central Role in Copper Homeostasis and Detoxification. Mol. and Cell. Bio., 26(6), 2286–2296. doi:10.1128/mcb.26.6.2286-2296.2006
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Bioch. Pharm., 7:88–95.
- Espinosa, F.; Rivera-Ingraham, G. A. 2016. Subcellular evidences of redox imbalance in well-established populations of an endangered limpet. Reasons for alarm? Marine Pollution Bulletin, 109(1): 72–80. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.06.019
- Fenoglio, S.; Badino, G.; Bona, F. 2002. Benthic macroinvertebrate communities as indicators of river environment quality: an experience in Nicaragua. Rev. biol. Trop. 50(3-4): 1125-1131
- Fisher, T. C.; Crane, M.; Callaghan, A. 2000. An optimized microtiterplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* Meigen. Environ.Toxic. and Chem., 19(7): 1749–1752. doi:10.1002/etc.5620190707
- Forcella, M.; Berra, E.; Giacchini, R.; Rossaro, B.; & Parenti, P. 2007. Increased alanine concentration is associated with exposure to fenitrothion but not carbamates in *Chironomus riparius* larvae. Ecotox. and Environ. Saf., 66(3): 326–334. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.10.015
- Frossard, A.; Vieira, L. V.; Carneiro, M. T. W. D.; Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R. 2020. Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. J. of Trace Elem. in Medic. and Bio., 126654. doi:10.1016/j.jtemb.2020.126654

- Gao, R.; Yuan, Z.; Zhao, Z.; Gao, X. 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. Bioelectrochem Bioenerg 45:41–45. https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98) 00072-5.
- Gendy, E.A.; Oyekunle, D.T.; Ifthikar, J.; Jaead, A.; Chen, Z. 2022. A review on the adsorption mechanism of different organic contaminants by covalent organic framework (COF) from the aquatic environment. Environ Sci Pollut Res, 29: 32566–32593. doi:10.1007/s11356-022-18726-w
- Gigliolli, A. A. S.; Lucena, A. L.; Lapenta, A. S. 2011. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (coleoptera: tenebrionidae). Rev. Saúde e Biol., 6:(1)25-35.
- Gillis, P. L.; Diener, L. C.; Reynoldson, T. B.; & Dixon, D. G. 2002. Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): Correlation with reproduction and growth. Environ. Toxic. and Chem., 21(9): 1836–1844. doi:10.1002/etc.5620210911
- Gimbert, F.; Geffard, A.; Guédron, S.; Dominik, J.; Ferrari, B. J. D. 2016. Mercury tissue residue approach in Chironomus riparius: Involvement of toxicokinetics and comparison of subcellular fractionation methods. Aquatic Toxicology, 171: 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.027
- Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R.; Miranda, T. O.; Pereira, T. M.; Merçon, J.; Davel, V. C.; Barbosa, B. V.; Pereira, A. C. H.; Frossard, A.; Ramos, J. P. L. 2018. Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. Braz. J. of Bio. 79(4). doi:10.1590/1519-6984.188086
- Grazioli, V.; Rossaro, B.; Parenti, P.; Giacchini, R.; Lencioni, V. 2016. Hypoxia and anoxic effects on alcohol dehydrogenase activity and hemoglobin content in *Chironomus riparius* Meigen, 1804. J. Limnol. 75:347-354. Doi: 10.4081/jlimnol.2016.1377
- Greenfield, B. K.; Teh, S. J.; Ross, J. R. M.; Hunt, J.; Zhang, G.; Davis, J. A.; Ichikawa, G.; Crane, D.; Hung, S. S. O.; Deng, D.; The, F.-C.; Green, P. G. 2008. Contaminant Concentrations and Histopathological Effects in Sacramento Splittail (Pogonichthys macrolepidotus). Arch Environ Contam Toxicol, 55: 270–281. doi:10.1007/s00244-007-9112-3
- Grueso-Gilaberth, R. N.; Jaramillo-Timarán, K. S.; Ospina-Pérez, E. M.; Richardi, V. S.; Ossa-López, P. A.; Rivera-Páez, F. A. 2020. Histological Description and Histopathology in Polypedilum sp. (Diptera: Chironomidae): A Potential Biomarker for the Impact of Mining on Tributaries. Annals of the Entomological Society of America. doi:10.1093/aesa/saaa008
- Gwenzi, W.; Chaukura, N. 2018. Organic contaminants in African aquatic systems: Current knowledge, health risks, and future research directions. Science of The Total Environment, 619-620: 1493–1514. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.121
- Ha, M.-H.; Choi, J. 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae

- of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. Chemosphere, 71(10): 1928–1936. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.01.018
- Hamilton, S. J.; Mehrle, P. M. 1986. Metallothionein in Fish: Review of Its Importance in Assessing Stress from Metal Contaminants. Transactions of the American Fisheries Society, 115(4): 596–609. doi:10.1577/1548-8659(1986)115<596:mif>2.0.co;2
- Herrero, Ó.; Planelló, R.; Morcillo, G. 2015. The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. Chemosphere, 128: 266–277. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.01.059
- Holtof, M.; Lenaerts, C.; Cullen, D.; Vanden Broeck, J. 2019. Extracel-lular nutrient digestion and absorption in the insect gut. Cell Tissue Res. 377(3):397-414
- Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle JR., P. M.; Bergman, H. L. (eds.), 1992, Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA
- Ingersoll, C. G. 1995. Sediments tests. In: G.M. RAND, org. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington: Taylon & Fancis, pp. 231-241.
- Ishimota, M.; Tajiki-Nishino, R.; Fukuyama, T.; Tomiyama, N. 2020. Rapid adaptationof *Chironomus yoshimatsui* to acetylcholinesterase inhibitors (pyraclofos and pirimicarb) in a multi-generation study. J. of Environ. Sci. and Health, Part B, 1–9. doi:10.1080/03601234.2019.1708165
- Jarial, M. S. 1988. Fine structure of the Malpighian Tubules of Chironomus larva in relation to glycogen storage and fate of hemoglobin. Tissue and Cell, 20(3): 355–380. doi:10.1016/0040-8166(88)90071-7
- Jeppe, K. J.; Carew, M. E.; Long, S. M.; Lee, S. F.; Pettigrove, V.; Hoffmann, A. A. 2014. Genes involved in cysteine metabolism of *Chironomus tepperi* are regulated differently by copper and by cadmium. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 162: 1–6. doi:10.1016/j.cbpc.2014.02.006
- Jerome, F. C.; Hassan, A.; Omoniyi-Esan, G. O.; Odujoko, O. O.; Chukwuka, A. V. 2017. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of Callinectes amnicola exposed to industrial effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 139: 179–193. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.032
- Jesus, F.; Pereira, J.; Campos, I.; Santos, M.; Ré.; Keiser, J.; Nogueira.; Gonçalves, A.; Abrantes, N.; Serpa, D. 2022. A rewiew on polycyclic aromatic hydrocarbons distribution in freshwater ecosystems and their toxicity to benthic fauna. Science of The Total Environment. 80: 153282
- Jiang, Z.; Hunt, j. V.; Wolff, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Anal. Biochem. 202: 384–389. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N

- Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione. The J. of Bio. Chem., 251(20):6183–6188.
- Khan, M. I.; Khisroon, M.; Khan, A.; Gulfam, N.; Siraj, M.; Zaidi, F.; Ahmadullah; Abidullah; Fatima, S. H.; Noreen, S.; Hamidullah; Shan, Z. A.; Qadir, F. 2018. Bioaccumulation of Heavy Metals in Water, Sediments, and Tissues and Their Histopathological Effects on Anodonta cygnea (Linea, 1876) in Kabul River, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. BioMed Research International, 1–10. doi:10.1155/2018/1910274
- Kheir, R.; Ibrahim, H.; Lewis, J.; Callaghan, A.; Crane, M. 2001. Comparison of Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activity in *Chironomus riparius* Meigen Exposed to Chemical-Spiked Sediments. Bull. of Environ. Contam. and Toxic., 66(5): 603–610. doi:10.1007/s001280051
- Kim, W. S.; Kim, R.; Park, K.; Nikapitya, C. 2015. The Molecular Biomarker Genes Expressions of Rearing Species *Chironomus riparius* and Field Species *Chironomus plumosus* Exposure to Heavy Metals. Korean J.of Ecol. and Environ., 48(2): 86-94.
- Kim, K. B.; Lee, B. M. 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. Cancer Lett 113:205–212. doi:10.1016/S0304-3835(97)04610-7
- Krantzberg, G.; Stokes, P.M. 1990. Metal concentrations and tissues distribution in larvae of Chironomus with reference to x-ray microprobe analysis. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 84–93. doi:10.1007/BF01059816
- Lavarías, S.; Arrighetti, F.; Siri, A. 2017. Histopathological effects of cypermethrin and Bacillus thuringiensis var. israelensis on midgut of Chironomus calligraphus larvae (Diptera: Chironomidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 139: 9–16. doi:10.1016/j.pestbp.2017.04.002
- Lee, S.-B.; Choi, J. 2006. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Environ. Toxic. And Chem., 25(11): 3006. doi:10.1897/05-601r1.1
- Leonard, E. M.; Pierce, L. M.; Gillis, P. L.; Wood, C. M.; O'Donnell, M. J. 2009. Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of Chironomus riparius. Aquatic Toxicology, 92(3): 179–186. doi:10.1016/j.aquatox.2009.01.011
- Leonard, E. M.; Belowitz, R.; Agema, P.; O'Donnell, M. J. 2018. Characterization of Cadmium and Calcium Fluxes Along the Gut, Malpighian Tubules and Anal Papillae of the Dipteran, Chironomus riparius. Environmental Toxicology and Chemistry. doi:10.1002/etc.4211
- Lesser, M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Annu. Rev. Physiol., 68: 253–278.
- Li, C. X.; Dong, Y. D.; Song, F. L.; Zhang, X. L.; Gu, W. D.; Zhao, T. Y. 2009. Company amplification of estalpha2/estbeta2 and correlation between esterase gene copynumber

- and resistance to insecticides in the field *Culex pipiens* pallens strains collected from Beijing, China. J. Med. Entomol., 46: 539-545.
- Liu, Y.; Liu, H.; Liu, S.; Wang, S.; Jiang, R. J.; Li, S. 2009. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. Arc. of Ins. Bioc. and Phys., 71(1): 16–30. doi:10.1002/arch.20290
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2-\Delta\Delta$ CT Method. Methods, 25(4): 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Locke, M. 1984. The Structure and Development of the Vacuolar System in the Fat Body of insects. In: Ed. King, R. C. & Akai, H. Insect ultrastructure. Vol. 2. Plenum Press. New York.
- Long, S. M.; Tull, D. L.; Jeppe, K. J.; De Souza, D. P.; Dayalan, S.; Pettigrove, V. J.; McConville, M. J.; Hoffmann, A. A. 2015. A multi-platform metabolomics approach demonstrates changes in energy metabolism and the transsulfuration pathway in *Chironomus* tepperi following exposure to zinc. Aquatic Toxic., 162: 54–65. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.009
- Lopez-Martinez, G.; Elnitsky, M. A.; Benoit, J. B.; Lee, R. E.; Denlinger, D. L. 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalaseand heat shock proteins. Insect Bioch. and Mol. Bio., 38(8): 796–804. doi:10.1016/j.ibmb.2008.05.006
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, 101(1): 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Luo, M.; Finet, C.; Cong, H.; Wei, H.; Chung, H. 2020. The evolution of insect metallothioneins. Proc. of the Roy. Soc. B: Biol. Sci., 287(1937): 20202189. doi:10.1098/rspb.2020.2189
- Lycett, G. J.; McLaughlin, L. A.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Kafatos, F. C.; Loukeris, T. G.; Paine, M. J. 2006. Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. Insect Mol. Biol. 15: 321–327.
- Macêdo, A. K. S.; dos Santos, K. P. E.; Brighenti, L. S.; Windmöller, C. C.; Barbosa, F. A. R.; de Azambuja Ribeiro, R. I. M.; dos Santos, H. B.; Thomé, R. G. 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings damin Mariana, MG, Brazil. Sci. of The Tot. Environ., 139505. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139505
- Makki, R.; Cinnamon, E.; Gould, A. P. 2014. The Development and Functions of Oenocytes. Annual Review of Entomology, 59(1): 405–425. doi:10.1146/annurev-ento-011613-162056
- Maraschi, A. C.; Marques, J. A.; Costa, S. R.; Vieira, C. E. D.; Geihs, M. A.; Costa, P.G.;

- Martins, C. M. G.; Sandrini, J, Z.; Bianchini, A.; Souza, M. M. 2022. Marine shrimpsas biomonitors of the Fundão (Brazil) mine dam disaster: A multi-biomarker approach. Environ. Pollu. 305: 119245
- Marques, J. A.; Costa, S. R.; Maraschi, A. C.; Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Martins, C. M. G.; Santos, H. F.; Souza, M. M.; Sandrini, J. Z.; Bianchini, A. 2022. Biochemical response and metals bioaccumulation in planktonic communities from marine areas impacted by the Fundão mine dam rupture (southeast Brazil). Sci. of The Tot. Environ. 806(3): 150727
- Martelli, A.; Rousselet, E.; Dycke, C.; Bouron, A.; Moulis, J.-M. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. Biochimie, 88(11): 1807–1814. doi:10.1016/j.biochi.2006.05.013
- Maycock, D.; Prenner, M.; Kheir, R.; Morris, S.; Callaghan, A.; Whitehouse, P.; Morritt, D.; Crane, M. 2003. Incorporation of in situ and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides. Water Res., 37(17): 4180–4190. doi:10.1016/s0043-1354(03)00337-3
- Mela, M.; Neto, F. F.; Yamamoto, F. Y.; Almeida, R.; Grötzner, S. R.; Ventura, D. F.; Ribeiro, C. A. O. 2014. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Fish Physiol. Biochem. 40:245–256. doi:10.1007/s10695-013-9840-4
- Mendikute, G. A.; Cajaraville, M. P. 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicol in Vitro, 17:539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Teixeira, B. C.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V.L.; Agostinho, S. G. N.; Vasconcelos, C. M.; Gomes, L. C. 2022. Seasonality effects on the metal concentration and biochemical changes in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from Doce River after the collapse of the Fundão dam in Mariana, Brazil. Environ. Toxic. and Pharm.. 89: 103777
- Moiseenko, T. I.; Gashkina, N. A. 2020. Distribution and bioaccumulation of heavy metals (Hg, Cd and Pb) in fish: influence of the aquatic environment and climate. Environ. Res. Lett. 15:115013
- Monteiro, H. R.; Pestana, J. L. T.; Novais, S. C.; Leston, S.; Ramos, F.; Soares, A. M. V. M.; Devreese, B.; Lemos, M. F. L. 2019b. Assessment of fipronil toxicity to the freshwater midge *Chironomus riparius*: molecular, biochemical, and organismal responses. Aquatic Toxic., 105292. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105292
- Monteiro, H. R.; Pestana, J. L. T.; Novais, S. C.; Soares, A. M. V. M.; Lemos, M. F. L. 2019a. Toxicity of the insecticides spinosad and indoxacarb to the non-target aquatic midge *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ..doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.303
- Montella, I. R.; Schama, R.; Valle, D. 2012. The classification of esterases: animportant gene family involved in insecticide resistance A Review. Mem Inst OswaldoCruz, 107(4):

- Morais, G. S.; Vieira, T. B.; Santos, G. S.; Dolatto, R. G.; Cestari, M. M.; Grassi, M. T.; Silva, M. A. N. 2020. Genotoxic, metabolic, and biological responses of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) after exposure to BBP. Sci. of The Tot. Environ., 136937. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136937
- Morais, G. S.; Vieira, T. B.; Santos, G. S.; Baika, L. M.; Cestari, M. M.; Grassi, M. T.; Navarro da Silva, M. A. 2019. Biological, biochemical and genotoxic effects of Sb in the midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae). Ecotoxic. and Environ. Saf., 176: 196–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.03.080
- Mugnai, R.; Buss, D. F.; Oliveira, R. B.; Sanfins, C.; Carvalho, A. do L.; Baptista, D. F. 2011. Application of the biotic index IBE-IOC for water quality assessment in wadeable streams in south-east Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia, 23(1): 74–85. doi:10.4322/actalb.2011.021
- Nair, P. M. G.; Choi, J. 2011. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. Aquatic Toxic., 101(3-4): 550–560. doi:10.1016/j.aquatox.2010.12.006
- Nath, B. B. 2018. Extracellular hemoglobin and environmental stress tolerance in *Chironomus* larvae. J. of Limno., 77(s1):104-112. doi:10.4081/jlimnol.2018.1805
- Naz, S.; Hussain, R.; Ullah, Q.; Chatha, A. M. M; Shaheen, A.; Khan, R. U. 2021. Toxic effect of some heavy metals on hematology and histopathology of major carp (Catla catla). Environ Sci Pollut Res 28: 6533–6539. doi:10.1007/s11356-020-10980-0
- O'Donnell, M. 2008. Insect Excretory Mechanisms. Advances in Insect Physiology Volume 35: 1–122. doi:10.1016/s0065-2806(08)00001-5
- Olive, P. L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. Environ. Mol. Mutagen. 11(4):487-495.
- Oliver, D. R. 1971. Life History of the Chironomidae. Annual Review of Entomology, 16(1): 211–230. doi:10.1146/annurev.en.16.010171.001235
- Osmulski, P. A.; Leyko, W. 1986. Structure, function and physiological role of *Chironomus* hemoglobin. Comp. biochem. Physiol. B 85: 701–722
- Özaslan, M. S.; Demir, Y.; Küfrevioğlu, O. I.; Çiftci, M. 2017. Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Van Lake fish gills. J. of Bioch. and Mol. Toxic., 31(11): e21967. doi:10.1002/jbt.21967
- Palacio-Cortés, A.; Signorini-Souza, I. L.; Hara, E. L. Y.; Disner, R. G.; Rebechi, D.; Grassi, M. T.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. A. 2017. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) effects on *Chironomus sancticaroli* larvae after short-term exposure. Ecotox. and Environ. Saf., 139:308-315

- Palumbo-Roe, B.; Wragg, J.; Banks, V.J. 2012. Lead mobilisation in the hyporheic zone and river bank sediments of a contaminated stream: contribution to diffuse pollution. J Soils Sediments, 12: 1633–1640. doi:10.1007/s11368-012-0552-7
- Park, K.; Kwak, I. 2012. Assessment of Potential Biomarkers, Metallothionein and Vitellogenin mRNA Expressions in Various Chemically Exposed Benthic *Chironomus riparius* Larvae. Ocean Sci. J. 47(4):435-444
- Park, K.; Bang, H. W.; Park, J.; Kwak, I.-S. 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. Chemosphere,77(3): 359–367. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.019
- Passos, L. S.; Gnocchi, K. G.; Pereira, T. M.; Coppo, G. C.; Cabral, D. S.; Gomes, L. C. 2020. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? Sci. of The Tot. Environ., 736: 139644. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139644
- Pasteur, N.; Nancé, E.; Bons, N. 2001. Tissue Localization of Overproduced Esterasesin the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. of Med. Entom., 38(6):791–801.
- Pierson, M. 1956. Contribution a l'histologie de l'appareil digestif de Chironomous plumosus L Annls Sci. nut. Zool., 11: 107-122
- Pinho, L.C. 2008. Diptera. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline
- Planelló, R.; Servia, M. J.; Gómez-Sande, P.; Herrero, O.; Cobo, F.; Morcillo, G. 2015. Transcriptional Responses, Metabolic Activity and Mouthpart Deformities in Natural Populations of *Chironomus riparius* Larvae Exposed to Environmental Pollutants. Environ. Toxic. 30(4):383-395.
- Pourang, N. 2021. Heavy Metals in Freshwater Invertebrates of Iran: A Review on the Bioaccumulation and Effects. In: Jawad, L.A. (eds) Tigris and Euphrates Rivers: Their Environment from Headwaters to Mouth. Aquatic Ecology Series, vol 11. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-57570-0\_67
- Printes, L. B.; Fernandes, M. N.; Espíndola, E. L. G. 2011. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. Ecotox. and Environ. Saf., 74(3): 424–430. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.033
- Printes, L. B.; Espíndola, E. L.G.; Fernandes, M. N. 2007. Biochemical Biomarkers in Individual Larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 2(1):53-60.
- Purać, J.; Čelić, T. V.; Vukašinović, E. L.; Đorđievski, S.; Milić, S.; Ninkov, J.; Kojić, D. 2021. Identification of a metallothionein gene and the role of biological thiols in stress induced by short-term Cd exposure in Ostrinia nubilalis. Comp. Bioc. Phis. C: Toxic. Pharm., 250: 109148

- Qi, H.; Li, H.; Ma, P.; You, J. 2015. Integrated sediment quality assessment through biomarker responses and bioavailability measurements: Application in Tai Lake, China. Ecotox. and Environ. Saf., 119: 148–154. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.05.007
- Rakotondravelo, M. L.; Anderson, T. D.; Charlton, R. E.; Zhu, K. Y. 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Arch. of Environ. Cont. and Toxic. 51: 360–366.
- Rebechi, D., Richardi, V. S., Vicentini, M., Guiloski, I. C., Assis, H. C. S., Navarro-Silva, M. A. 2014. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. Rev. Bras. entomol. 58(3):296–301.
- Rebechi, D.; Palacio-Cortés, A. M.; Richardi, V. S.; Beltrão, T.; Vicentini, M.; Grassi, M. T.; da Silva, S. B.; Alessandre, T.; Hasenbein, S.; Connon, R.; Navarro-Silva, M. A.2021. Molecular and biochemical evaluation of effects of malathion, phenanthrene and cadmium on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) larvae. Ecotox. and Environ. Saf., 211: 111953. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.111953
- Richard, C.; Canonica, S. 2005. Aquatic Phototransformation of Organic Contaminants Induced by Coloured Dissolved Natural Organic Matter. In: Boule, P., Bahnemann, D.W., Robertson, P.K.J. (eds) Environmental Photochemistry Part II. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 2M. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/b138187
- Richardi, V. S.; Vicentini, M.; Rebechi, D.; Fávaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2015. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge Chironomus sancticaroli Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). Revista Brasileira de Entomologia. 59: 240-250.
- Richardi, V. S.; Vicentini, M.; Morais, G. S.; Rebechi, D.; da Silva, T. A.; Favaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2018. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) Environ. Pollu. 242:277-287.
- Richmond, R., Gilbert, D., Sheehan, K., Gromko, M., & Butterworth, F. 1980. Esterase and reproduction in *Drosophila melanogaster*. Science, 207(4438): 1483–1485. doi:10.1126/science.6767273
- Rodrigues, A. C. M.; Gravato, C.; Quintaneiro, C.; Golovko, O.; Žlábek, V.; Barata, C.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2015b. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ., 508: 506–513. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.021
- Saffarini, D. A.; Trewitt, P. M.; Luhm, R. A.; Bergtrom, G. 1991. Differential regulation of insect globin and actin mRNAs during larval development in *Chironomus thummi*. Gene 101: 215–222.
- Samarco. 2006. Atualização do Plano de Recuperação Ambiental Integrado. Disponível

- em <a href="https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/01/prai\_renova\_jan17\_rev03.pdf">em <a href="https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/01/prai\_renova\_jan17\_rev03.pdf">https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/01/prai\_renova\_jan17\_rev03.pdf</a> Acessado em: 25/05/2023
- Schin, K.; Laufer, H.; Carr, E. 1977. Cytochemical and electrophoretic studies of haemoglobin synthesis in the fat body of a midge, Chironomus thummi. Journal Insect Physiology 23: 1233-1242.
- Seidman, L. A.; Bergtrom, G.; Gingrich, D. J.; Remsen, C. C. 1986. Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly Chironomus thummi. Tissue and Cell, 18(3): 395–405. doi:10.1016/0040-8166(86)90059-5
- Sharma, V.J.; Satyanarayan, S. 2011. Effect of selected heavy metals on the histopathology of different tissues of earthworm Eudrillus eugeniae. Environ Monit Assess, 180(1-4):257–267. doi:10.1007/s10661-010-1786-8
- Signorini-Souza, I. L.; Palacio-Cortés, A. M.; Beltrão-Graboski, T.; Richardi, V. S.; Fávaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2020. Cell demage induced by polybrominated diphenyl ethers on Chironomus sancticaroli (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras. Entom. 64(1): e201950.
- Silva de Assis, H. C. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.
- Silva, C.; Wanderley-Teixeira, V.; Cunha, F.; Oliveira, J.; Dutra, K.; Navarro, D. F.; Teixeira, A. 2017. Effects of citronella oil (Cymbopogon winterianus Jowitt ex Bor) on Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) midgut and fat body. Biotechnic & Histochemistry, 1–13.
- Skowronek, P.; Wójcik, L.; Strachecka, A. 2021. Fat body Multifunctional Insect Tissue. Insects. 12(6): 547. doi:10.3390/insects12060547
- Slobodian, M. R.; Petahtegoose, J. D.; Wallis, A. L.; Levesque, D. C.; Merritt, T. J. 2021. The Effects of Essential and Non-Essential Metal Toxicity in the Drosophila melanogaster Insect Model: A Review. Toxics, 9(10): 269. doi: 10.3390/toxics9100269
- Somparn, A.; Iwai, C. B.; Noller, B. N. 2017. Assessment of pesticide contaminated sediment using biological response of tropical chironomid, *Chironomus javanus* Kifferas biomarker. Asian Pacif. J. of Trop. Biomed., 7(8): 719–724. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.014
- Somparn, A.; Iwai, C. B.; Noller, B. 2015. Potential use of acetylcholinester-ase, glutathione-S-transferase and metallothionein for assessment of contaminated sediment in tropical chironomid, *Chironomus javanus*. J. Environ. Biol., 36:1355-1359
- Stegeman, J. J.; Brouwer, M.; Di Giulio, R. T.; Förlin, L.; Fowler, B. A.; Sanders, B. M.; van Veld, P. A. 1992, Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. In: R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle Jr. and H. L Bergman (eds.). Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Stojanović, J.; Miloševi, D. D.; Vitorović, J. S.; Savić Zdravković, D. N.; Stanković, N. R.;

- Stanković, J. B.; Vasiljević, P. J. 2021. Histopathology of Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) exposed to metal oxide nanoparticles. Arch Biol Sci. 73(3):319-329
- Sturm, A.; Hansen, P.-D. 1999. Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. Ecotox. and Environ. Saf., 42(1): 9–15. doi:10.1006/eesa.1998.1721
- Sumi, Y.; Suzuzki, T.; Yamamura, M.; Hatakeyama, S.; Sugaya, Y.; Suzuki, K. T. 1984. Histochemical staining of cadmium taken up by the midge larva, Chironomus yoshimatsui (diptera, chironomidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 79(3): 353–356. doi:10.1016/0300-9629(84)90526-7
- Tao, Y.; Yuan, Z.; Xiaona, H.; Wei, M. 2012. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and potential health risk assessment from Taihu lake, China. Ecotoxicology and Environmental Safety, 81: 55–64. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.04.014
- Taylor, K. G.; Owens, P. N. 2009. Sediments in urban river basins: a review of sediment—contaminant dynamics in an environmental system conditioned by human activities. J. of Soils and Sediments, 9(4): 281–303. doi:10.1007/s11368-009-0103-z
- Thomaidi, V. S.; Stasinakis, A. S.; Borova, V. L.; Thomaidis, N. S. 2015. Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. Journal of Hazardous Materials, 283: 740–747. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.023
- Tokhun, N.; Iwai, C. B.; Noller, B. N. 2017. Metal Concentrations and Responses of Chironomid Larvae Exposed to Thailand Pulp and Paper Mill Effluent. Bull. of Environ. Contam. and Toxic., 99(5): 548–554. doi:10.1007/s00128-017-2166-7
- Turcherro, M.; Diotto, A.; Tallandini, L. 1981. In vitro study of esterase inhibition in the midge *Chironomus thummi* Kieff. (Diptera, Chironomidae). Boll. Z00l. 48: 335-339.
- Trivinho-Strixino, S.; Strixino, G. 1989. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região Neotropical (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras.de Entom., 33 (2): 207-216.
- Vafopoulou-Mnadalos, X.; Laufer, H. 1984. Tissue-Specificity of Hemoglobin Synthesis: localization of Heme Synthesis in the Subepidermal Fat Body of Chironomus thummi (Diptera). Archives of insect Biochemistry and Physiology 191- 197
- Valle, D.; Montella, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 1(1):128, 2006.
- Van Praet, N.; De Jonge, M.; Stoks, R.; Bervoets, L. 2014. Additive effects of predator cues and dimethoate on different levels of biological organisation in the non-biting midge *Chironomus riparius*. Aquatic Toxic., 155: 236–243. doi:10.1016/j.aquatox.2014.07.001
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E.; Blasco, J. 1999. Role

- of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Am. J. Physiol., 277:1612-1619
- Vicentini, M.; Morais, G. S.; Rebechi-Baggio, D.; Richardi, V. S.; Santos, G. S.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. A. 2017. Benzo(a)pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae *of Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). Neotr. Entom., 46(6): 658–665. doi:10.1007/s13744-017-0505-3
- Vieira, C. E. D.; Marques, J. A.; da Silva, N. G.; Bevitório, L. Z.; Zebral, Y. D.; Maraschi, A. C.; Costa, S. R.; Costa, P. G.; Damasceno, E. M.; Pirovani, J. C. M.; Vale-oliveira, M.; Souza, M. M.; Martins, C. M. G.; Bianchini, A.; Sandrini, J. Z. 2022. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. Sci. of the tot. environ., 832: 154878.
- Vos, R. M. E.; Van Bladeren, P. J. 1990. Glutathione S-transferases in relation to theirrole in the biotransformation of xenobiotics. Chemico-Biological Interactions, 75(3): 241–265. doi:10.1016/0009-2797(90)90069-y
- Wang, L.; Song, L.; Ni, D.; Zhang, H.; Liu, W. 2009. Alteration of metallothionein mRNAin bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 149:50-57
- Weber, A. A.; Sales, C. F.; de Souza Faria, F.; Melo, R. M. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. Ecotox. Environ. Saf., 190: 110165. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110165
- Xie, Z.; Gan, Y.; Tang, J.; Fan, S.; Wu, X.; Li, X.; Cheng, H.; Tang, J. 2020. Combined effects of environmentally relevant concentrations of diclofenac and cadmium *on Chironomus riparius* larvae. Ecotox. Environ. Saf., 202: 110906. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110906
- Xu, Z-B.; Zou, X-P.; Zhang, N.; Feng, Q-L.; Zheng, S-C. 2015. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera* litura. Insect Science, 22: 503–511
- Yamamoto, F. Y.; Pauly, G. E.; Nascimento, L. S.; Fernandes, G. M.; Santos, M. P.; Kim.; Carvalho, M. U.; Figueira, R. C. L.; Cavalcante, R. M.; Grassi, M. T.; Abessa, M. T. 2022a. Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River years after the mining dam collapse disaster. 45:108715. doi: 10.1016/j.dib.2022.108715.
- Yamamoto, F. Y.; Souza, A. T. C.; de Paula, V. C. S.; Beverari, I.; Garcia, J. R. E.; Padial, A. A.; Abessa, D. M. S. 2022b. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. Sci. os the Tot. Environ., 846: 157332.
- Yamamoto, F. Y., Onishi, K., Ralha, T. R., Silva, L. F. O., Deda, B., Pessali, T. Y. C., Souza, C., Oliveira Ribeiro, C. A., & Abessa, D. M. S. 2023a. Earlier biomarkers infish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce RiverBasin.

Environ.I Pollu., 329, 121720. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.121720

Yamamoto, F. Y.; Pauly, G. F. E.; Nascimento, L. S.; Fernandes, G. M.; Santos, M. P.; Figueira, R. C. L.; Cavalcante, R. M.; Grassi, M. T.; Abessa, D. M. S. 2023b. Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sourcesof contamination and a major environmental disaster. J. of Haz. Mat. Adv., 9: 100250. https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100250

Zheng, X.; Xu, Z.; Qin, G.; Wu, H.; Wei, H. 2017. Cadmium exposure on tissue-specific cadmium accumulation and alteration of hemoglobin expression in the 4th-instar larvae of Propsilocerus akamusi (Tokunaga) under laboratory conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety. 144: 187-192.

Zoumis, T.; Schmidt, A.; Grigorova, L.; Calmano, W. 2001. Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. Sci. of The Tot. Environ., 266(1-3): 195–202. doi:10.1016/s0048-9697(00)00740-3

## **CONCLUSÕES GERAIS**

A bacia do Rio Doce é historicamente negligenciada quanto a impactos ambientais ocasionadas por atividades antrópicas. Durante mais de três séculos as atividades vinculadas a extração e processamento de minérios predominam no alto Rio Doce. Estas atividades são facilmente observadas pelas alterações geomorfológicas da paisagem e pelas inúmeras barragens construidas ao longo das cidades, muitas das quais, com risco de rompimento.

Em 2015, o rompimento da barragem de rejeitos de extração de minérios de ferro Fundão, em Mariana (MG), carreou ao longo de toda a bacia resíduos desses rejeitos e ocasionou o revolvimento do sedimento que estava depositado no fundo, ressuspendendo diversos contaminantes que foram alojados durante os últimos séculos.

Conforme observado pelas análises multivariadas a composição química de todos os sedimentos coletados ao longo de seis pontos da bacia é influenciada por metais, principalmente no alto Rio Doce próximo ao rompimento da barragem do Fundão. Além dos metais, produtos químicos orgânicos como HPAs e piretroides, introduzidos por outras atividades humanas parecem influenciar fortemente na composição química dos sedimentos do médio Rio Doce, onde há presença de indústrias e centros urbanos sem tratamento adequado de esgoto, os quais acabam sendo diluidos nos rios que abrangem a bacia do Rio Doce, como no seu rio principal, Rio Doce.

Esta complexa mistura de contaminantes inorgânicos e orgânicos comprometeram a sobrevivência e alteraram o desenvolvimento de *Chironomus* sancticaroli, organismo bentônico intrinscicamente associado a esses sedimentos.

Através das analises histológicas foi possível observar que grande parte do sedimento estava concentrado no sistema digestório da larva e em menor quantidade em grânulos e grãos no citoplasma das células do intestino e túbulos de Malpighi. Isto pode ser explicado pelo hábito alimentar detritívoro e ao efluxo de metais por trocas iônicas para o interior das células. A frequência das alterações do sistema digestório e as alterações nas células do corpo gorduroso foram maiores nos pontos do médio Rio Doce, podendo indicar que a complexicidade química dos sedimentos neste segmento do rio, parecem potencializar os efeitos nas células.

No médio Rio Doce também foi constatado a presença de maiores níveis de matéria orgânica e a granulometria do sedimento mais fina que podem ter corroborado para que os contaminantes estivessem mais associados aos sedimentos, biodisponíveis e que fossem mais facilmente ingeridos pelos organismos. Este segmento do rio, também apresentou os maiores scores de alterações subletais em diferentes biomarcadores, principalmente nos biomarcadores de biotransformação de compostos orgânicos e estresse oxidativo, enquanto a expressão gênica das hemoglobinas e metalotioneina apresentaram os maiores níveis nos pontos do alto Rio Doce, associadas principalmente com as atividades de mineração passadas e atuais.

Ao que tudo indica os sedimentos da bacia parecem influenciar fortemente o organismo bentônico utilizado nesta pesquisa. O alto rio possui elevada concentração de metais na composição, alguns superiores aos valores máximos permitidos em legislação, contudo os pontos do médio Rio Doce parecem causar mais efeitos, observados a níveis subletais e letais observados em *C. sancticaroli*.

Políticas públicas voltadas para o saneamento urbano, fiscalização de atividades poluidoras e potencialmente poluidoras, bem como a fiscalização para que desastres socioambientais não ocorram novamente, podem mitigar os danos ambientais crônicos na bacia do Rio Doce. Proporcionar o desenvolvimento sustentável da região, corroborando para o bem estar social e ambiental, e para a gestão eficiente dos multiplos usos dos recursos hídricos é necessário para que as futuras gerações e os seres vivos que vivem nesses ambientes possam continuar coexistindo.

## REFERENCIAS GERAIS

ABNT. NBR 15.469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2007. pp. 7

Adakole, J. A., Anunne, P. A. 2003. Benthic macroinvertebrates as indicators of environmental quality of an urban stream, Zaria, Northern Nigeria. Journal of Aquatic Sciences. 18(2): 85-92

Adams, W.; Blust, R.; Dwyer, R.,; Mount, D.; Nordheim, E.; Rodriguez, P. H.; Spry, D. 2019. Bioavailability Assessment of Metals in Freshwater Environments: A Historical Rev. Environ. Toxic. and Chem., 39(1): 48–59. doi:10.1002/etc.4558

Aebl, H. 1984. Catalase in vitro method. Enzymol., 105:121–126.

Akkanen, J.; Slootweg, T.; Mäenpää, K..; Leppänen, M. T.; Agbo, S.; Gallampois, C.; Kukkonen, J. V. K. 2012. Bioavailability of Organic Contaminants in Freshwater Environments. Emerging and Priority Pollutants in Rivers. The Hand. of Environ. Chem., vol 19. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-25722-3 2

Ali, H.; Khan, E.; & Ilahi, I. 2019. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation.J. of Chem., 2019: 1–14. doi:10.1155/2019/6730305

Allocati, N.; Masulli, M.; Di Ilio, C.; Federici, L. 2018. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. Oncogenesis. 7(8):1-15.

Amde, M.; Liu, J.; Tan, Z. Q.; Bekana, D. 2017. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. Env, Pollu., 230: 250–267. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.064

Amiard, J.; Amiardtriquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxic., 76(2): 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015

ANA, disponível em\_<a href="https://www.ana.gov.br/sala-de-situacao/rio-doce/rio-doce-saiba-mais">https://www.ana.gov.br/sala-de-situacao/rio-doce/rio-doce-saiba-mais</a> Acessado em 25/05/2023.

Anders, M. W. 2008. Chemical Toxicology of Reactive Intermediates Formed by the Glutathione-Dependent Bioactivation of Halogen-Containing Compounds. Chem. Res. in Toxic., 21(1): 145–159. doi:10.1021/tx700202w

Arambourou, H.; Gismondi, E.; Branchu, P.; Beisel, J. N. 2013. Biochemical and morphological responses in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to lead-spiked sediment. Environ. Toxic. and Chem., n/a–n/a. doi:10.1002/etc.2336

- Arambourou, H.; Planelló, R.; Llorente, L.; Fuertes, I.; Barata, C.; Delorme, N.; Noury, P.; Herrero, Ó.; Villeneuve, A.; Bonnineau, C. 2019. *Chironomus riparius* exposure tofield-collected contaminated sediments: From subcellular effect to whole-organism response. Sci. Total Environ, 671, 874–882.
- Ardestani, M. M.; van Straalen, N. M.; van Gestel, C. A. M. 2015. Biotic ligand modeling approach: Synthesis of the effect of major cations on the toxicity of metals to soil and aquatic organisms. Environ. Toxic. and Chem., 34(10): 2194–2204. doi:10.1002/etc.3060
- Arrese, E. L.; Soulages, J. L. 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. Annual Review of Entomology, 55(1): 207–225. doi: 10.1146/annurev- ento-112408-085356
- ATSDR, 2004. Toxicological Profile for Polybrominated Biphenyl and Polybrominated Diphenyl Ethers, Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia, pp. 1-564.
- Azevedo-Pereira, H. M. V. S.; Lemos, M. F. L.; Soares, A. M. V. M. 2011. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. Ecotox. and Env. Saf., 74(5): 1210–1215. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.03.018
- Azrina, M. Z.; Yap, C. K.; Rahim Ismail, A.; Ismail, A.; Tan, S. G. 2006. Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64(3): 337–347. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.04.003
- Ballesteros, M. L.; Boyle, R. L.; Kellar, C. R.; Miglioranza, K. S. B.; Bistoni, M. A.; Pettigrove, V.; Long, S. M. 2020. What types of enzyme activities are useful biomarkersof bifenthrin exposure on *Chironomus sp.* (Diptera, Chironomidae) larvae underlaboratory and field-based microcosm conditions?. Aqu. Toxic., 228: 105618. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105618
- Barboza, L.G.A.; Vieira, L.R.; Branco, V.; Carvalho, C.; Guilhermino, L.. 2018. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. Sci. Rep., 8: 15655. doi:10.1038/s41598-018-34125-z
- Barroso, G. F. Lagoas costeiras do Espírito Santo: perspectivas para conservação. In: Menezes, Luiz Fernando, et al., (orgs). Ecossistemas costeiros do Espírito Santo: conservação e restauração. Vitória, EDUFES: 71-86. 2007
- Beaty, B. J.; Mackie, R. S.; Mattingly, K. S.; Carlson, J. O.; Rayms-Keller, A. 2002. The Midgut Epithelium of Aquatic Arthropods: A Critical Target Organ in Environmental Toxicology. Environ. Health Pers., 110(6):911-914. doi:10.1289/ehp.02110s6911
- Beauvais, S. L.; Atchison, G. J.; Stenback, J. Z.; Crumpton, W. G. 1999. Use of cholinesterase activity to monitor exposure of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) to a pesticide mixture in hypoxic wetland mesocosms. Hydrobiologia, 416, 163–170. doi:10.1023/A:1003819621659

- Bednářová, A.; Krishnan, N.; Cheng, I.-C.; Večeřa, J.; Lee, H.-J.; Kodrík, D. 2013. Adipokinetic hormone counteracts oxidative stress elicited in insects by hydrogen peroxide: in vivo and in vitro study. Physiol. Entomol., 38: 54–62.
- Belek, N.; Erkmen, B.; Dinçel, A.S.; Gunal, A. C. 2022. Does persistent organic pollutant PFOS (perfluorooctane sulfonate) negative impacts on the aquatic invertebrate organism, Astacus leptodactylus [Eschscholtz, 1823]. Ecotoxicology 31: 1217–1230. doi:10.1007/s10646-022-02579-7
- Beliaeff, B.; Burgeout, T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Env. Toxic. and Chem.. 21:1316–1322.
- Belowitz, R.; O'Donnell, M. J. 2013. Ion-selective microelectrode measurements of TI+and K+ transport by the gut and associated epithelia in *Chironomus riparius*. Aquatic Toxic., 138-139: 70–80. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.013
- Bendell-Young, L. I.; Bennett, K. E.; Crowe, A.; Kennedy, C. J.; Kermode, A. R.; Moore, M. M.; Plant, A. L.; Wood, A. 2000. Ecological characteristics of wetlands receiving an industrial effluent. Ecol. Appli., 10(1):310–322. doi:10.1890/1051-0761(2000)010[0310:ecowri]2.0.co;2
- Bergtrom, G.; Laufer, H.; Rogers, R. 1976. Fatbody: A site of hemoglobin synthesis in *Chironomus thummi* (Diptera). J. Cell Biol. 69: 264-274.
- Bevitório, L. Z.; da Silva, N. G.; Pirovani, J. C. M.; Marques, J. A.; Vieira, C. E. D.; Zebral, Y. D.; Damasceo, E. M.; Lopes, L. L. R.; SantAna, L. P.; Marube, L. C.; Costa, S. R.; Martins, C. M. G.; Sandrini, J. Z.; Souza, M. M.; Bianchini, A.; Vale-Oliveira, M.2022. Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. Mar. Pollu. Bull.. 177: 113511
- Bhavan, P. S.; Geraldine, P. 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn Macrobrachium malcolmsonii exposed to endosulfan. Aquatic Toxicology, 50(4): 331–339. doi:10.1016/s0166-445x(00)00096-5
- Borba, R. P.; Figueiredo, B. R.; Rawlins, B.; Matschullat, J. 2002. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. Environ. Geo., 44(1): 39–52. doi:10.1007/s00254-002-0733-6
- Borch, T.; Kretzschmar, R.; Kappler, A.; Cappellen, P. V.; Ginder-Vogel, M.; Voegelin, A.; Campbell, K. 2010. Biogeochemical Redox Processes and their Impact on Contaminant Dynamics. Env. Sci. & Tech., 44(1): 15–23. doi:10.1021/es9026248
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Bioch., 72(1-2): 248–254.
- Briegel, H.; Freyvogel, T. A.. 1971. Non-specific esterases during development of Culicine mosquitoes. Acta Trop., 28:291-297.

- Browder, M. H.; D'Amico, L. J.; Nijhout, H. F. 2001. The role of low levels of juvenile hormone esterase in the metamorphosis of *Manduca sexta*. J. Insect Sci., 1:11.
- Brown, B. E. 1982. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. Biological Reviews, 57(4): 621–667. doi:10.1111/j.1469-185x.1982.tb00375.x
- Buell, M.-C.; Johannessen, C.; Drouillard, K.; & Metcalfe, C. 2020. Concentrations and source identification of PAHs, alkyl-PAHs and other organic contaminants in sediments from a contaminated harbor in the Laurentian Great Lakes. Environmental Pollution, 116058. doi:10.1016/j.envpol.2020.116058
- Burton Jr, G.A.; Denton, D.L.; Ho, K.; Ireland, D.S. 2003. Sediment toxicity testing: issues and methods. In: Hofman DJ, Rattner GA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (eds) Handbook of ecotoxicology. Lewis Publishers, New York, pp 111–150.
- Cain, D. J.; Luoma, S. N.; Wallace, W. G. 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. Environ. Toxic. and Chem., 23(6): 1463. doi:10.1897/03-291
- Cagnin, R. C.; Quaresma, V. S.; Chaillou, G.; Franco, T.; Bastos, A. C. 2017. Arsenic enrichment in sediment on the eastern continental shelf of Brazil. Sci. of The Tot.Environ., 607-608: 304–316. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.162
- Callaghan, A.; Hirthe, G.; Fisher, T.; Crane, M. 2001. Effect of Short-Term Exposure to Chlorpyrifos on Developmental Parameters and Biochemical Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. Ecotox. and Environ. Saf., 50(1): 19–24. doi:10.1006/eesa.2001.2071
- Callaghan, A.; Fisher, T. C.; Grosso, A.; Holloway, G. J.; Crane, M. 2002. Effect of Temperature and Pirimiphos Methyl on Biochemical Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. Ecotox. and Environ. Saf., 52(2): 128–133. doi:10.1006/eesa.2002.2160
- Campos, D.; Silva, A. R. R.; Loureiro, S.; Grabicová, K.; Staňová, A. V.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2019. Two-generational effects of Benzophenone-3 on the aquatic midge *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ., 669: 983-990. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.023
- Canonica, S. (2007). Oxidation of Aquatic Organic Contaminants Induced by Excited Triplet States. CHIMIA International Journal for Chemistry, 61(10), 641–644. doi:10.2533/chimia.2007.641
- Carvalho, M. S.; Moreira, R. M.; Ribeiro, K. D.; Alemida, A. M. 2017. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. Acta Bras. 1(3): 37-41
- Carvalho, G. O.; Pinheiro, A. D. A.; de Sousa, D. M.; Padilha, J. D. A.; Souza, J. S.; Galvao, P. M.; Paiva, T. D. C.; Freire, A. S.; Santelli, R. E.; Malm, O.; Torres, J. P. M. 2018. Metals and Arsenic in Water Supply for Riverine Communities Affected by the Largest Environmental Disaster in Brazil: The Dam Collapse on Doce River. Orb.: The Elec. Jour. of Chem., 10(4 SI):299-307. doi:10.17807/orbital.v10i4.1081

- Castro, P. T. A.; Nalini Jr, H. A.; Lima, H. M. 2011. Entendendo a mineração no QuadriláteroFerrífero. Belo Horizonte: Ecológico. pp. 93.
- Cavalcanti, J.A.D.; da Silva, M.S.; Schobbenhaus, C.; Lima, H.de M. 2021.Geo- Mining Heritages of the Mariana Anticline Region, Southeast of Quadrilátero Ferrífero-MG, Brazil: Qualitative and Quantitative Assessment of Chico Rei and Passagem Mines. Geoheritage 13: 98. https://doi.org/10.1007/s12371-021-00631-2
- Cesar, R.; Egler, S.; Polivanov, H.; Castilhos, Z.; Rodrigues, A. P. 2011. Mercury, copper and zinc contamination in soils and fluvial sediments from an abandoned goldmining area in southern Minas Gerais State, Brazil. Environ. Earth Sci., 64: 211–222. doi:10.1007/s12665-010-0840-8
- CETESB. 2018. Disponível em: <a href="https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/HPAs-Hidrocarbonetos-Polic%C3%ADclicos-Arom%C3%A1ticos.pdf">https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/HPAs-Hidrocarbonetos-Polic%C3%ADclicos-Arom%C3%A1ticos.pdf</a> Acessado em: 25/05/2023
- Chang, Y. W; Wang, Y. C.; Yan, Y. Q.; Wu, C. D.; Xie, H. F.; Gong, W. R.; Du. Y. Z. 2022. Insect hormones affect the toxicity of the insecticidal groth regulator cyromazinein *Liriomyza trifolli* (Diptera: Agromyzidae). Pest. Bioc. and Phis., 188:105263
- Chapman, P. M. 1985. Effects of gut sediment contents on measurements of metal levels in benthic invertebrates a Cautionary Note. Bulle. of Environ. Cont. and Toxic., 35(1): 345–347. doi:10.1007/bf01636520
- Chapman, P. U. 1989. Concepts and strategies for biological monitoring. London: GEMS/University of London. 45 p.
- Chapman, R.F. 2012. The insects: structure and function. Cambridge University Press, New York. pp. 959
- Chelvanayagam, G.; Parker, M. W.; Board, P. G. 2001. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. Chem-Biol Inter., 133(1-3): 256–260.
- Chertemps, T.; François, A,; Durand, N.; Rosell, G.; Dekker, T.; Lucas, P.; Maibeche-Coisne, M. 2012. A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. BMC Biol. 10:56.
- Chiang, M.W.-L.; Au, D.W.-T. 2013. Histopathological approaches in ecotoxicology. In: Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 597e614. doi:10.1007/978-94-007-5704-2 56.
- Choi, J.; Roche, H. 2004. Effect of potassium dichromate and fenitrothion on hemoglobins of *Chironomus riparius* Mg (Diptera, Chironomidae) larvae: Potential biomarker of environmental biomonitoring. Environ. Monit. Assess. 92:229-239.
- Choi, J.; Ha, M. H. 2009. Effect of cadmium exposure on the globin protein expressionin 4th instar larvae of *Chironomus riparius* Mg (Diptera: Chironomidae): an ecotoxicoproteomics approach. Proteomics 9:31-39

- Choi, J.; Caquet, T.; Roche, H. 2002. Multilevel effects of sublethal fenitrothionexposure in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae. Environ. Toxic. and Chem., 21(12): 2725–2730. doi:10.1002/etc.5620211228
- Choi, J.; Roche, H.; Caquet, T. 1999. Characterization of superoxide dismutase activityin *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae a potential biomarker. Comp. Biochem. Physiol. C Pharm., Toxicol. and Endoc., 124(1): 73–81. doi:10.1016/s0742-8413(99)00045-6
- Choi, Y. K.; Jo, P. G.; Choi, C. Y. 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 147:286-292
- Chung, H.; Sztal, T.; Pasricha, S.; Sridhar, M.; Batterham, P.; Daborn, P. J. 2009. Characterization of Drosophila melanogaster cytochrome P450 genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 5731–5736
- Clements, W. H. 2004. Small-scale experiments support causal relationships between metal contamination and macroinvertebrate community responses. Ecol. Applic., 14(3): 954–967. doi:10.1890/03-5009
- Clements, W. H.; Cadmus, P.; Brinkman, S. F. 2013. Responses of Aquatic Insects to Cu and Zn in Stream Microcosms: Understanding Differences Between Single SpeciesTests and Field Responses. Environ. Sci. & Tech., 47(13): 7506–7513. doi:10.1021/es401255h
- Cobbett, C.; Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Ann. Rev. Plant Biol., 53:159-182.
- Coelho, A. L. N. 2007. Modelagem hidrológica da bacia do Rio Doce (MG/ES) com base em imagens srtm (shuttle radar topography mission). Caminhos de Geografia, 8(22): 116-131.
- Coelho, A. L. N. 2009. Bacia Hidrográfica do Rio Doce (MG/ES): Uma Análise Socioambiental Integrada. Geografares. Vitória, 7:131-146.
- Connell, D.W. 1988. Bioaccumulation Behavior of Persistent Organic Chemicals with Aquatic Organisms. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Eds.: Ware, G.W.). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer, New York, New York. doi: 10.1007/978-1-4612-3810-2\_3
- Consorcio Ecoplan-Lume, 2010a. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio Doce e planos de ações para as unidades de planejamento e gestãode recursos hídricos no âmbito da bacia do rio Doce. Contrato Nº 043/2008 IGAM, Vol. 1, 2010. pp: 472. Disponível em: <www.cbhdoce.org.br>
- Coppo, G.C.; Passos, L.S.; Lopes, T.O.M; Pereira, T. M.; Cabral, D. S.; Barbosa, B. V.; Caetano, L. S.; Kampke, E. H.; Chippari-Gomes, A. R. 2018. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Ecotoxicology, 27: 1150–1160. doi: 10.1007/s10646-018-1970-0

- Corbi, J. J.; Froehlich, C. G.; Strixino, S. T.; & Santos, A. dos. 2010. Bioaccumulation of metals in aquatic insects of streams located in areas with sugar cane cultivation. Quím. Nova, 33(3): 644–648. doi:10.1590/s0100-40422010000300030
- Costa, A.T.; Nalini, H.A.; de Lena, J.C.; Friese, K.; Mages, M. 2003. Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Braz. Env. Geo., 45: 226–235. doi:10.1007/s00254-003-0870-6
- Costantini, D. 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. Ecology Letters, 11(11): 1238–1251. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01246.x
- Costa, A.T.; Nalini Jr, H.A.; de Lena, J.C.; Mages, M. 2003. Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. Env Geol, 45: 226–235. doi:10.1007/s00254-003-0870-6
- Costa, C. R.; Olivi, P. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova, 31(7):1820-1830.
- Craig, A.; Hare, L.; Charest, P.-M.; Tessier, A. 1998. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). Aquatic Toxic., 41(3): 265–275. doi:10.1016/s0166-445x(97)00085-4
- Crane, M.; Sildanchandra, W.; Kheir, R.; Callaghan, A. 2002. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. Ecotox. and Environ. Saf., 53(3): 361–369. doi:10.1016/s0147-6513(02)00038-6
- Cranston, P. The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges. In: Armitage, P., P. S. Cranston & L. C. V. Pinder (Ed.). The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges. London: Chapman & Hall. 1995.
- Crawford, S. E.; Brinkmann, M.; Ouellet, J. D.; Lehmkuhl, F.; Reicherter, K.; Schwarzbauer, J.; Bellanova, P.; Letmathe, P.; Blank, L. M.; Weber, R.; Crack, W.; Dongen, J. T.; Menzel, L.; Hecjer, M.; Schuttrumpf, H. Hollert, H. 2022. Remobilization of pollutants during extreme flood events poses severe risks to human and environmental health. J. of Haz. Mat., 421: 126691. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126691
- Cruz-Landim, C. 2009. Abelhas: Morfologia e Função dos Sistemas. 1ed. São Paulo: UNESP
- Da Penha Rhodes, V.; de Lena, J. C.; Santolin, C. V. A.; Pinto, T. S.; Mendes, L. A.; Windmoller, C. C. 2018. Speciation and quantification of Hg in sediments contaminated by artisanal gold mining in the Gualaxo do Norte River, Minas Gerais, SE, Brazil. Environ. Monit. Assess., 190: 49. doi:10.1007/s10661-017-6394-4
- Da Silva, C. A.; Coutinho, A. D.; de Oliveira-Júnior, J. F.; Teodoro, P. E.; Lima, M.; Shakir, M.; Gois, G.; Johann, J. A. 2018. Analysis of the impact on vegetation causedby abrupt deforestation via orbital sensor in the environmental disaster of Mariana, Brazil. Land Use Policy, 76: 10–20. doi:10.1016/j.landusepol.2018.04.019

Dahan-Moss, Y. L; koekemoer, L. L. 2016. Analysis of esterase enzyme activity in adults of the major malaria vector *Anopheles funestus*. Paras. & Vect., 9:110.

Dal Pizzol, J. L.; Marques, J. A.; Fonseca, J. S.; Costa, P. G.; Bianchini, A. 2022. Metal accumulation induces oxidative stress and alters carbonic anhydrase activity in coralsand symbionts from the largest reef complex in the South Atlantic ocean. Chemosphere. 290: 133216

De Almeida, E. A.; Bainy, A. C. D.; Loureiro, A. P. M.; Martinez, G. R.; Miyamoto, S.; Onuki, J.; Barbosa, L. F.; Garcia, C. C. M.; Prado, F. M.; Ronsein, G. E.; Sigolo, C. A.; Bronchini, C. B.; Martins, A. M. G.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage.Comp. Bioc. and Phys. A: Mol. & Int. Phys.,146(4): 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040

De Matos, A.R., da Silva, H.T., da Faria, M.C.S.; Freire, B. M.; Batista, B. L.;Rodrigues, J. L. 2022. Environmental disaster in mining areas: routes of exposure to metals in the Doce River basin. Int. J. Environ. Sci. Technol. 19: 12091–12102.doi:10.1007/s13762-022-03981-8

De Paiva Magalhães, D.; da Costa Marques, M. R.; Baptista, D. F.; Buss, D. F. 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. Environ. Chem. Lett., 13(1): 69–87. doi:10.1007/s10311-015-0491-9

De Souza, A. C.; Cabral, A. C.; da Silva, J.; Neto, R. R.; Martins, C. C. 2022. Low levels of persistent organic pollutants in sediments of the Doce River mouth, South Atlantic, before the Fundão dam failure. Sci. of The Tot. Environ., 802: 149882. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149882

Dennis, I. A.; Coulthard, T. J.; Brewer, P.; Macklin, M. G. 2009. The role of floodplainsin attenuating contaminated sediment fluxes in formerly mined drainage basins. EarthSurf. Process. Landf, 34: 453–466.

Dhadialla, T. S.; Carlson, G. R.; Le, D. P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. of Entom., 43(1): 545–569. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.545

Dickson, K. L.; Waller, W.T.; Kennedy, J. H.; Ammann, L. P. 1992. Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. Environ. Toxic. Chemi. 11:1307-1322.

Domingues, I.; Guilhermino, L.; Soares, A. M. V. M.; Nogueira, A. J. A. 2007. Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: Potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. Chemosphere, 69(1): 145–154. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.013

Dornfeld, C. B. Utilização de Chironomus sp (Diptera, Chiromidae) para a Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental – Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2006.

Dornfeld, C. B.; Rodgher, S.; Negri, R. G.; Espíndola, E. L. G.; Daam, M. A. 2019. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a Sensitive Tropical Test Speciesin Laboratory Bioassays Evaluating Metals (Copper and Cadmium) and Field Testing. Arc. of Environ. Cont. and Toxic., 76: 42–50.

Dorr J.V.N II. 1969. Physiographic, stratigraphic and structural development of the Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. U.S. Geological Survey Professional Paper 641-A, pp. 117.

Dos Reis, D.A.; Nascimento, L.P.; de Abreu, A.T.; Nalini Jr, a.; Roeser, H. M.P.; Santiago, A. F. 2020. Geochemical evaluation of bottom sediments affected by historicmining and the rupture of the Fundão dam, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res., 27:4365–4375. doi:10.1007/s11356-019-07119-1

Duarte, E. B.; Neves, M. A.; Benda de Oliveira, F.; Martins, M. E.; Rodrigues de Oliveira, C. H.; Burak, D. L.; Orlando, M. T D.; Gabrig Turbay Range, C. V. 2020. Tracemetals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. Chemosphere, 127879. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127879

Duran, M.; Michailova, P.; Sari, A.; Ilkova, J.; Sen, A.; Karadurmus, E. 2012. .Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae). Acta Zool. Bulga., 64(4):167–173..

Dussault, È. B.; Balakrishnan, V. K.; Borgmann, U.; Solomon, K. R.; Sibley, P. K. 2009. Bioaccumulation of the synthetic hormone 17α-ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*. Ecotox. Environ. Safety, 72(6): 1635–1641. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.019

Dwiyitno, Dsikowitzky, L.; Nordhaus, I.; Andarwulan, N.; Irianto, H. E.; Lioe, H. N.; Ariyani, F.; Kleinertz, S.; Schwarzbauer, J. 2016. Accumulation patterns of lipophilic organic contaminants in surface sediments and in economic important mussel and fishspecies from Jakarta Bay, Indonesia. Mar. Pollu. Bulle., 110(2): 767–777. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.034

Eagleson, K. W.; Lenat, D. L; Ausley, L. W.; Winborne, F. B. 1990. Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the Cerio *Daphnia dubia* chronic toxicity test. Environ. Toxicol. Chemistry, 9: 1019-1028.

Edwards, M.; Usher, M. B. 1985. The winged Antarctic midge Parochlus steinenii (Gerke) (Diptera: Chironomidae), in the South Shetland Islands. Biological Journal of the Linnaean Society, 26: 83–93.

Eggleton, J.; Thomas, K. V. 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. Environ. Inter., 30(7): 973–980. doi:10.1016/j.envint.2004.03.001

- Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A.,... Schaffner, W. (2006). A Family Knockout of All Four Drosophila Metallothioneins Reveals a Central Role in Copper Homeostasis and Detoxification. Mol. and Cell. Bio., 26(6), 2286–2296. doi:10.1128/mcb.26.6.2286-2296.2006
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Bioch. Pharm., 7:88–95.
- EMBRAPA Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária Sistema Brasileiro de Classi-ficação de Solos. Brasília: EMBRAPA, 1999. pp. 412.

Environmental Canada. 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Environmental Protection Series, Ottawa, Ont., Rept EPS 1/RM/12

EPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1790 Chironomid Sediment Toxicity Test. Washington: U.S. Environmental Protection Agency; 1996.

Espinosa, F.; Rivera-Ingraham, G. A. 2016. Subcellular evidences of redox imbalance in well-established populations of an endangered limpet. Reasons for alarm? Marine Pollution Bulletin, 109(1): 72–80. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.06.019

Fan, W. H.; Cui, M. M.; Shi, Z. W.; Tan, C.; & Yang, X. P. 2012. Enhanced Oxidative Stress and Physiological Damage in *Daphnia magna* by Copper in the Presence of Nano-TiO2. Journ. of Nanomat., 1–7. doi:10.1155/2012/398720

Fenoglio, S.; Badino, G.; Bona, F. 2002. Benthic macroinvertebrate communities as indicators of river environment quality: an experience in Nicaragua. Rev. biol. Trop. 50(3-4): 1125-1131

Fernandes, G. W.; Goulart, F. F.; Ranieri, B. D.; Coelho, M. S.; Dales, K.; Boesche, N.; Bustamante, M.; Carvalho, F. A.; Carvalho, D. C.; Dirzo, R.; Fernandes, S.; GalettiJr., P. M.; Millan, V. E. G.; Mielke, C.; Ramirez, J. L.; Neves, A.; Rogass, C.; Ribeiro, S. P.; Scariot, A.; Soares-Filho, B. 2016. Deep into the mud: ecological and socio- economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. Nat. & Cons., 14(2): 35–45. doi:10.1016/j.ncon.2016.10.003

Ferreira, F. F.; Duca de Freitas, M. B.; Szinwelski, N.; Vicente, N.; Medeiros, L. C. C.; Reynaud Schaefer, C. E. G.; Dergam, J. A.; Sperber, C. F. 2020. Impacts of the Samarco tailing dam collapse on metals and arsenic concentration in freshwater fish muscle from Doce River, southeastern Brazil. Int. Environ. Ass. Manag., 16(5): 622-630. doi:10.1002/jeam.4289

Ferrington, L.C. 2007. Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. In: Balian, E.V., Lévêque, C., Segers, H., Martens, K. (eds) Freshwater Animal Diversity Assessment. Developments in Hydrobiology, vol 198. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-1-4020-8259-7\_45

- Fisher, T. C.; Crane, M.; Callaghan, A. 2000. An optimized microtiterplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* Meigen. Environ. Toxic. and Chem., 19(7): 1749–1752. doi:10.1002/etc.5620190707
- Forcella, M.; Berra, E.; Giacchini, R.; Rossaro, B.; & Parenti, P. 2007. Increased alanine concentration is associated with exposure to fenitrothion but not carbamates in *Chironomus riparius* larvae. Ecotox. and Environ. Saf., 66(3): 326–334. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.10.015
- Fraga, M.D.; Reis, G.B.; da Silva, D.D.; Guedes, A. S.; Elesbon, A. A. A. 2020. Use of multivariate statistical methods to analyze the monitoring of surface water quality in the Doce River basin, Minas Gerais, Brazil. Environ Sci Pollut Res, 27: 35303–35318. doi:10.1007/s11356-020-09783-0
- Freire, M. M.; Santos, V. G.; Ginuino, I. S. F.; Aras, A. R. L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras., 12(3): 347-354.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64: 97–112.
- Frossard, A.; Vieira, L. V.; Carneiro, M. T. W. D.; Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R. 2020. Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. J. of Trace Elem. in Medic. and Bio., 126654. doi:10.1016/j.jtemb.2020.126654
- Gao, R.; Yuan, Z.; Zhao, Z.; Gao, X. 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. Bioelectrochem Bioenerg 45:41–45. https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98) 00072-5.
- Gaskell, P. N.; Brooks, A. C.; Maltby, L. 2007. Variation in the Bioaccumulation of a Sediment-Sorbed Hydrophobic Compound by Benthic Macroinvertebrates: Patterns and Mechanisms. Environ. Sci. & Tech., 41(5): 1783–1789. doi:10.1021/es061934b
- Geiser, D. L.; Winzerling, J. J. 2012. Insect transferrins: Multifunctional proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects, 1820(3): 437–451. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.011
- Gendy, E.A.; Oyekunle, D.T.; Ifthikar, J.; Jaead, A.; Chen, Z. 2022. A review on the adsorption mechanism of different organic contaminants by covalent organic framework (COF) from the aquatic environment. Environ Sci Pollut Res, 29: 32566–32593. doi:10.1007/s11356-022-18726-w
- Gigliolli, A. A. S.; Lucena, A. L.; Lapenta, A. S. 2011. Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (coleoptera: tenebrionidae). Rev. Saúde e Biol., 6:(1)25-35.
- Gillis, P. L.; Diener, L. C.; Reynoldson, T. B.; & Dixon, D. G. 2002. Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): Correlation with reproduction and growth. Environ. Toxic. and Chem., 21(9): 1836–1844. doi:10.1002/etc.5620210911

- Gimbert, F.; Geffard, A.; Guédron, S.; Dominik, J.; Ferrari, B. J. D. 2016. Mercury tissue residue approach in Chironomus riparius: Involvement of toxicokinetics and comparison of subcellular fractionation methods. Aquatic Toxicology, 171: 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.027
- Giongo, A.; dos Anjos Borges, L. G.; Marconatto, L.; de Lara Palhano, P.; Serbent, M.P.; Moreira-Silva, E.; Siqueira, P. L.; Martinho, C. T.; Barili, R.; Paz, L. V.; Moser, L. I.; Veríssimo, C. M.; Ketzer, J. M. M.; Medina-Silva, R. 2020. Adaption of microbial communities to the hostile environment in the Doce River after the collapse of two iron ore tailing dams. Heliyon, 6(8): e04778. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04778
- Girardin, V.; Grung, M.; Meland, S. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bioaccumulation in dragonfly nymphs (Anisoptera), and determination of alkylated forms in sediment for an improved environmental assessment. Sci Rep 10: 10958. doi:10.1038/s41598-020-67355-1
- Girotto, L.; Espíndola, E.L.G.; Gebara, R.C.; Freitas, J. S. 2020. Acute and Chronic Effects on Tadpoles (Lithobates catesbeianus) Exposed to Mining Tailings from the Dam Rupture in Mariana, MG (Brazil). Water Air Soil Pollut., 231: 325. doi:10.1007/s11270-020-04691-y
- Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R.; Miranda, T. O.; Pereira, T. M.; Merçon, J.; Davel, V. C.; Barbosa, B. V.; Pereira, A. C. H.; Frossard, A.; Ramos, J. P. L. 2018. Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. Braz. Journ. of Biol., 79(4). doi:10.1590/1519-6984.188086
- Gomes, M. P.; Brito, J. C. M.; Viera, F.; Kitamura, F. S. A.; Juneau, P. 2022. Emerging Contaminants in Streams of Doce River Watershed, Minas Gerais, Brazil. Frontiers in Environmental Science. 9: 801599. doi: 10.3389/fenvs.2021.801599
- Goodyear, K. L.; McNeill, S. 1998. Bioaccumulation of Heavy Metals by Freshwater Insect Larvae. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Rev. of Env. Contam. and Toxic. (Eds.: Ware, G.W.), vol 158. Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4612-1708-4\_3
- Gower, A. M.; Darlington, S. T. 1990. Relationships between copper concentrations in larvae of *Plectrocnemia conspersa* (Curtis) (Trichoptera) and in mine drainage streams. Environ. Pollu., 65(2): 155–168. doi:10.1016/0269-7491(90)90181-b
- Grazioli, V.; Rossaro, B.; Parenti, P.; Giacchini, R.; Lencioni, V. 2016. Hypoxia and anoxic effects on alcohol dehydrogenase activity and hemoglobin content in *Chironomus riparius* Meigen, 1804. J. Limnol. 75:347-354. Doi: 10.4081/jlimnol.2016.1377
- Greenfield, B. K.; Teh, S. J.; Ross, J. R. M.; Hunt, J.; Zhang, G.; Davis, J. A.; Ichikawa, G.; Crane, D.; Hung, S. S. O.; Deng, D.; The, F.-C.; Green, P. G. 2008. Contaminant Concentrations and Histopathological Effects in Sacramento Splittail (Pogonichthys macrolepidotus). Arch Environ Contam Toxicol, 55: 270–281. doi:10.1007/s00244-007-9112-3

- Grueso-Gilaberth, R. N.; Jaramillo-Timarán, K. S.; Ospina-Pérez, E. M.; Richardi, V. S.; Ossa-López, P. A.; Rivera-Páez, F. A. 2020. Histological Description and Histopathology in Polypedilum sp. (Diptera: Chironomidae): A Potential Biomarker for the Impact of Mining on Tributaries. Annals of the Entomological Society of America. doi:10.1093/aesa/saaa008
- Guerra, M.B.B.; Teaney, B.T.; Mount, B.J.; Asunskis, D. J.; Jordan, B. T.; Barker, R. J.; Santos, E. E.; Schaefer, C. E. G. R. 2017. Post-catastrophe Analysis of the Fundão Tailings Dam Failure in the Doce River System, Southeast Brazil: Potentially Toxic Elements in Affected Soils. Water Air Soil Pollut., 228: 252. doi:10.1007/s11270-017-3430-5
- Gwenzi, W.; Chaukura, N. 2018. Organic contaminants in African aquatic systems: Current knowledge, health risks, and future research directions. Science of The Total Environment, 619-620: 1493–1514. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.121
- Ha, M.; Choi, J. 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvaeof aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarkerfor ecotoxicity monitoring. Chemosphere, 71:1928-1936.
- Hamilton, S. J.; Mehrle, P. M. 1986. Metallothionein in Fish: Review of Its Importance in Assessing Stress from Metal Contaminants. Transactions of the American Fisheries Society, 115(4): 596–609. doi:10.1577/1548-8659(1986)115<596:mif>2.0.co;2
- Hare, L.; Tessier, A.; Borgmann, U. 2003. Metal Sources for Freshwater Invertebrates: Pertinence for Risk Assessment. Human and Ecol. Risk Ass.: An Inter. Journal, 9(4): 779–793. doi: 10.1080/713610009
- Harizanova, N.; Georgieva, T.; Dunkov, B. C.; Yoshiga, T.; Law, J. H. 2005. *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. Insect Mol. Biol.,14: 79–88.
- Hatje, V.; Pedreira, R. M. A.; de Rezende, C. E.; Schettini, C. A. F.; Souza, G. C.; Marin, D. C.; Hackspacher, P. C. 2017. The environmental impacts of one of the largesttailing dam failures worldwide. Sci. Rep., 7: 10706. doi:10.1038/s41598-017-11143-x
- Hayford, B. L.; Sublette, J. E.; Herrmann, S. J. 1995. Distribution of chironomids (Diptera: Chironomidae) and ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae) along aColorado thermal spring effluent. Journ. of the Kansas Entom. Society (Special Publication 1), 68: 77–92.
- Herrero, Ó.; Planelló, R.; Morcillo, G. 2015. The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. Chemosphere, 128: 266–277. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.01.059
- Herrero, Ó.; Aquilino, M.; Sánchez-Argüello, P.; & Planelló, R. 2018. The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera Chironomidae). PLOS ONE, 13(2): e0193387.doi:10.1371/journal.pone.0193387

- Holmstrup, M.; Bouvrais, H.; Westh, P.; Wang, C.; Slotsbo, S.; Waagner, D.; Waagner, D.; Ipsen, J. H. 2014. Lipophilic Contaminants Influence Cold Tolerance of Invertebrates through Changes in Cell Membrane Fluidity. Environ. Sci. & Tech., 48(16): 9797–9803. doi:10.1021/es502221g
- Holtof, M.; Lenaerts, C.; Cullen, D.; Vanden Broeck, J. 2019. Extracel-lular nutrient digestion and absorption in the insect gut. Cell Tissue Res. 377(3):397-414 Honda, M.; Suzuki, N. 2020. Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. Int. J. Environ. Res. Public Health, 17: 1363. doi:10.3390/ijerph17041363
- Hong, Y. S.; Kinney, K. A.; Reible, D. 2011. Effects of cyclic changes in pH and salinityon metals release from sediments. Environ. Toxicol. Chem., 30:1775–1784
- Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle JR., P. M.; Bergman, H. L. (eds.), 1992, Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA
- Ikenaka, Y.; Ito, Y.; Eun, H.; Watanabe, E.; Miyabara, Y. 2008. Characteristics of accumulation patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in the organisms inhabitedin Lake Suwa. J. Environ. Chem., 18: 341–352
- Ingersoll, C. G. 1995. Sediments tests. In: G.M. RAND, org. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington: Taylon & Fancis, pp. 231-241
- Inza, B.; Rouleau, C.; Tjälve, H.; Ribeyre, F.; Campbell, P. G. C.; Pelletier, É.; Boudou, A. 2001. Fine-Scale Tissue Distribution of Cadmium, Inorganic Mercury, and Methylmercury in Nymphs of the Burrowing Mayfly *Hexagenia rigida* Studied by Whole-Body Autoradiography. Environ. Res., 85(3): 265–271. doi:10.1006/enrs.2000.4228
- Isnard, P., & Lambert, S. (1988). Estimating bioconcentration factors from octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. Chemosphere, 17(1), 21–34. doi:10.1016/0045-6535(88)90040-9
- Ishimota, M.; Tajiki-Nishino, R.; Fukuyama, T.; Tomiyama, N. 2020. Rapid adaptationof *Chironomus yoshimatsui* to acetylcholinesterase inhibitors (pyraclofos and pirimicarb) in a multi-generation study. J. of Environ. Sci. and Health, Part B, 1–9. doi:10.1080/03601234.2019.1708165
- Jarial, M. S. 1988. Fine structure of the Malpighian Tubules of Chironomus larva in relation to glycogen storage and fate of hemoglobin. Tissue and Cell, 20(3): 355–380. doi:10.1016/0040-8166(88)90071-7
- Jeppe, K. J.; Carew, M. E.; Long, S. M.; Lee, S. F.; Pettigrove, V.; Hoffmann, A. A. 2014. Genes involved in cysteine metabolism of *Chironomus tepperi* are regulated differently by copper and by cadmium. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 162: 1–6. doi:10.1016/j.cbpc.2014.02.006

- Jerome, F. C.; Hassan, A.; Omoniyi-Esan, G. O.; Odujoko, O. O.; Chukwuka, A. V. 2017. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of Callinectes amnicola exposed to industrial effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 139: 179–193. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.032
- Jesus, F.; Pereira, J.; Campos, I.; Santos, M.; Ré.; Keiser, J.; Nogueira.; Gonçalves, A.; Abrantes, N.; Serpa, D. 2022. A rewiew on polycyclic aromatic hydrocarbons distribution in freshwater ecosystems and their toxicity to benthic fauna. Science of The Total Environment. 80: 153282
- Jiang, Z.; Hunt, j. V.; Wolff, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Anal. Biochem. 202: 384–389. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N
- Jiang, L.; Peng, L. L.; Cao, Y. Y.; Thakur, K.; Hu, F.; Tang, S. M.; Wei, Z. J. 2020. Transcriptome analysis reveals gene expression changes of the fat body of silkworm (*Bombyx mori L.*) in response to selenium treatment. Chemosphere, 245: 125660. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125660
- Johnson, R. K.; Wiederholm, T.; Rosenberg, D. M. 1993. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates (eds: M. Rosenberg & V. H. Resh), New York: Chapman & Hall. pp. 40-158
- Johnson, E. C.; Braco, J. T.; Whitmill, M. A. 2014. Connecting nutrient sensing and the endocrine control of metabolic allocation in insects. Cur. Op. in Ins. Sci., 1: 66–72. doi:10.1016/j.cois.2014.05.005
- Jørgensen, A.; Giessing, A. M. B.; Rasmussen, L. J.; & Andersen, O. 2008. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes. Marine Environ. Res., 65(2): 171–186. doi:10.1016/j.marenvres.2007.10.001
- Keen, J. H.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione. The J. of Bio. Chem., 251(20):6183–6188.
- Khan, M. I.; Khisroon, M.; Khan, A.; Gulfam, N.; Siraj, M.; Zaidi, F.; Ahmadullah; Abidullah; Fatima, S. H.; Noreen, S.; Hamidullah; Shan, Z. A.; Qadir, F. 2018. Bioaccumulation of Heavy Metals in Water, Sediments, and Tissues and Their Histopathological Effects on Anodonta cygnea (Linea, 1876) in Kabul River, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. BioMed Research International, 1–10. doi:10.1155/2018/1910274
- Kheir, R.; Ibrahim, H.; Lewis, J.; Callaghan, A.; Crane, M. 2001. Comparison of Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activity in *Chironomus riparius* Meigen Exposed to Chemical-Spiked Sediments. Bull. of Environ. Contam. and Toxic., 66(5): 603–610. doi:10.1007/s001280051
- Kiffney, P.M.; Clements, W. H. 1993. Bioaccumulation of heavy metals by benthic invertebrates at the Arkansas River, Colorado. Environ. Toxic. Chem., 12: 1507-1517.

- Kim, W. S.; Kim, R.; Park, K.; Nikapitya, C. 2015. The Molecular Biomarker Genes Expressions of Rearing Species *Chironomus riparius* and Field Species *Chironomus plumosus* Exposure to Heavy Metals. Korean J.of Ecol. and Environ., 48(2): 86-94.
- Kim, K. B.; Lee, B. M. 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. Cancer Lett 113:205–212. doi:10.1016/S0304-3835(97)04610-7
- King-Jones, K.; Thummel, C. S. 2005. Developmental biology. Less steroids make bigger flies. Science, 310:630–631.
- Kodrík, D.; Bednářová, A.; Zemanová, M.; Krishnan, N. 2015. Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects—An Update. Inter. J. of Mol. Sci., 16(10): 25788–25816. doi:10.3390/ijms161025788
- Koshima, S. 1984. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. Nature 310: 225–227.
- Kranztberg, G.; Stokes, P. M. 1989. Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46:389–398
- Krantzberg, G.; Stokes, P.M. 1990. Metal concentrations and tissues distribution in larvae of *Chironomus* with reference to x-ray microprobe analysis. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 84–93. doi: 10.1007/BF01059816
- Lam, P. K. S.; Gray, J.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmers. Marine Pollu. Bull., 46:182-186.
- Langer-Jaesrich, M.; Köhler, H. R.; Gerhardt, A. 2009. Assessing Toxicity of the Insecticide Thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) Using Multiple End Points. Arch. of Environ. Cont. and Toxic., 58(4): 963–972. doi:10.1007/s00244-009-9420-x
- Lapworth, D. J.; Baran, N.; Stuart, M. E.; Ward, R. S. 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. Environ. Pollut., 163:287–303. doi:10.1016/j.envpol.2011.12.034
- Lavarías, S., Arrighetti, F.; Siri, A. 2017. Histopathological effects of cypermethrin and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on midgut of *Chironomus calligraphus* larvae (Diptera: Chironomidae). Pest. Biochm. and Phys., 139:9-16.
- Lee, S.-B.; Choi, J. 2006. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Environ. Toxic. And Chem., 25(11): 3006. doi:10.1897/05-601r1.1
- Lee, S.-M.; Lee, S.-B.; Park, C.-H.; Choi, J. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. Chemosphere, 65(6):1074–1081.

- Leonard, E. M.; Pierce, L. M.; Gillis, P. L.; Wood, C. M.; O'Donnell, M. J. 2009. Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of Chironomus riparius. Aquatic Toxicology, 92(3): 179–186. doi:10.1016/j.aquatox.2009.01.011
- Leonard, E. M.; Belowitz, R.; Agema, P.; O'Donnell, M. J. 2018. Characterization of Cadmium and Calcium Fluxes Along the Gut, Malpighian Tubules and Anal Papillae of the Dipteran, *Chironomus riparius*. Environ. Toxic. Chem., 37(10): 2542-2549. doi:10.1002/etc.4211
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Annu. Rev. Physiol. 68: 253–278.
- Li, C. X.; Dong, Y. D.; Song, F. L.; Zhang, X. L.; Gu, W. D.; Zhao, T. Y. 2009. Company amplification of estalpha2/estbeta2 and correlation between esterase gene copynumber and resistance to insecticides in the field *Culex pipiens* pallens strains collected from Beijing, China. J. Med. Entomol., 46: 539-545.
- Li, J.; Xue, B.; Cheng, X.; Hu, J.; Hu, J.; Tian, J.; Li, F.; Yu, X.; Li, B. 2018. TiO2 NPs Alleviates High-Temperature Induced Oxidative Stress in Silkworms. J. of Econ. Entom., 111(2): 879–884. doi:10.1093/jee/toy002
- Lima, A. da C.; Heleno, F. F.; Afonso, R. J. de C. F.; Coutrim, M. X. 2015. Determination of PAHs in Surface Waters from the Doce and Piracicaba Rivers in Brazil. J. of Wat. Res. and Prot., 7(5): 422-429
- Linevich, A. A. 1971. The Chironomidae of Lake Baikal. Limnologica (Berlin) 8: 51–52
- Liu, Y.; Liu, H.; Liu, S.; Wang, S.; Jiang, R. J.; Li, S. 2009. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. Arc. of Ins. Bioc. and Phys., 71(1): 16–30. doi:10.1002/arch.20290
- Liu, D.; Pann, L.; Zhen, P. L. Z. C. Y.; Miao, J. 2014. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo(a)pyrene. Ecotox. Environ. Saf. 107: 251–259. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.024
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2-\Delta\Delta$ CT Method. Methods, 25(4): 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Livingstone, D. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp. Bioch. and Phys. Part A: Mol. & Integ. Phys.,120(1): 43–49. doi:10.1016/s1095-6433(98)10008-9
- Lobato, L. M.; Ribeiro-Rodrigues, L.C.; Vieira, F. W. 2001. Brazil's premier gold province. Part II: geology and genesis of gold deposits in the Archean Rio das Velhasgreenstone belt, Quadrilátero Ferrífero. Min. Dep., 36: 249–277. doi:10.1007/s001260100180

- Lobato L.M.; Vieira F.W.R.; Ribeiro-Rodrigues L.C.; Pereira L.M.M.; Menezes M.G.; Junqueira P.A.; Pereira S.L.N. 1998. Styles of hydrothermal alteration and gold mineralization associated with the Nova Lima Group of the Quadrilátero Ferrífero, Part I. Description of selected gold deposits. Revis. Bras. Geoc., 28(3):339-354. doi: 10.25249/0375-7536.1998339354
- Locke, M. 1984. The Structure and Development of the Vacuolar System in the Fat Body of insects. In: Ed. King, R. C. & Akai, H. Insect ultrastructure. Vol. 2. Plenum Press. New York.
- Locke, M.; Nichol, H. 1992. Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. Ann. review of entom., 37(1): 195-215
- Long, S. M.; Tull, D. L.; Jeppe, K. J.; De Souza, D. P.; Dayalan, S.; Pettigrove, V. J.; McConville, M. J.; Hoffmann, A. A. 2015. A multi-platform metabolomics approach demonstrates changes in energy metabolism and the transsulfuration pathway in *Chironomus* tepperi following exposure to zinc. Aquatic Toxic., 162: 54–65. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.009
- Longhini, C. M.; Rodrigues, S. K.; Costa, E. S.; da Silva, C. A.; Cagnin, R. C.; Gripp, M.; ... Sá, F. 2022. Environmental quality assessment in a marine coastal area impacted by mining tailing using a geochemical multi-index and physical approach. Sci. of The Tot. Environ., 803:149883. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149883
- Lopez-Martinez, G.; Elnitsky, M. A.; Benoit, J. B.; Lee, R. E.; Denlinger, D. L. 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalaseand heat shock proteins. Insect Bioch. and Mol. Bio., 38(8): 796–804. doi:10.1016/j.ibmb.2008.05.006
- Lorenz, M. W.; Gade, G. 2009. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. Int. and Comp. Biol., 49(4): 380–392. doi:10.1093/icb/icp019
- Lunardelli, B.; Cabral, M. T.; Vieira, C. E. D.; Oliveira, L. F.; Risso, W. E.; Melettl, P. C.; Martinez, C. B. R. 2018. Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. Ecotoxicol. Environ. Saf, 153:188-194.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, 101(1): 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Luo, M.; Finet, C.; Cong, H.; Wei, H.; Chung, H. 2020. The evolution of insect metallothioneins. Proc. of the Roy. Soc. B: Biol. Sci., 287(1937): 20202189. doi:10.1098/rspb.2020.2189
- Lycett, G. J.; McLaughlin, L. A.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Kafatos, F. C.; Loukeris, T. G.; Paine, M. J. 2006. Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. Insect Mol. Biol. 15: 321–327.

- Macêdo, A. K. S.; dos Santos, K. P. E.; Brighenti, L. S.; Windmöller, C. C.; Barbosa, F. A. R.; de Azambuja Ribeiro, R. I. M.; dos Santos, H. B.; Thomé, R. G. 2020. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings damin Mariana, MG, Brazil. Sci. Total Environ., 139505. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139505
- Mackay, D. M.; Roberts, P. V.; Cherry, J. A. 1985. Transport of organic contaminants in groundwater. Environ. Science & Tech., 19(5): 384–392. doi:10.1021/es00135a001
- Magalhães, D. P.; Ferrão Filho, A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, 12(3):355-381.
- Makki, R.; Cinnamon, E.; Gould, A. P. 2014. The Development and Functions of Oenocytes. Annual Review of Entomology, 59(1): 405–425. doi:10.1146/annurev-ento-011613-162056
- Mantilla, J. G.; Gomes, L.; Cristancho, M. A. 2018. The differential expression of *Chironomus* spp genes as useful tools in the search for pollution biomarkers in freshwater ecosystems. Brief. in Func. Gen., 17(3): 151–156.doi:10.1093/bfgp/elx021
- Maraschi, A. C.; Marques, J. A.; Costa, S. R.; Vieira, C. E. D.; Geihs, M. A.; Costa, P.G.; Martins, C. M. G.; Sandrini, J. Z.; Bianchini, A.; Souza, M. M. 2022. Marine shrimps as biomonitors of the Fundão (Brazil) mine dam disaster: A multi-biomarker approach. Environ. Pollu., 305: 119245
- Marinković, M.; Verweij, R. A.; Nummerdor, G. A.; Jonker, M. J.; Kraak, M. H. S.; Admiraal, W. 2011. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. Environ. science & tech., 45(4):1645–51.
- Marques, J. A.; Costa, S. R.; Maraschi, A. C.; Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Martins, C. M. G.; Santos, H. F.; Souza, M. M.; Sandrini, J. Z.; Bianchini, A. 2022. Biochemical response and metals bioaccumulation in planktonic communities from marine areas impacted by the Fundão mine dam rupture (southeast Brazil). Sci. of The Tot. Environ. 806(3): 150727
- Martelli, A.; Rousselet, E.; Dycke, C.; Bouron, A.; Moulis, J.-M. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. Biochimie, 88(11): 1807–1814. doi:10.1016/j.biochi.2006.05.013
- Martin, S.; Proulx, I.; & Hare, L. 2008. Explaining metal concentrations in sympatric *Chironomus* species. Limn. and Ocean., 53(2): 411–419. doi:10.4319/lo.2008.53.2.0411
- Martinez, E. A.; Moore, B. C.; Schaumloffel, J.; Dasgupta, N. 2004. Effects of exposureto a combination of zinc- and lead-spiked sediments on mouthpart development and growth in *Chironomus tentans*. Environ. Toxic. and Chem., 23(3): 662. doi:10.1897/02-512
- Martinez-Finley, E. J., Sudipta Chakraborty, S.; Fretham, S. J. B.; Aschner, M. 2012. Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals, Metallomics, 4(7):593–605, doi:10.1039/c2mt00185c

- Martínez-Jerónimo F.; Cruz-Cisneros, J. L.; García-Hernández, L. 2008. A comparisonof the response of Simocephalus mixtus (Cladocera) and *Daphnia magna* to contaminated freshwater sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf., 71:26–31
- Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J. L.; Morcillo, G. 2013. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. Mutation Research/Genetic Tox. & Environ. Mutag., 758(1-2): 41–47. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.09.005
- Maycock, D.; Prenner, M.; Kheir, R.; Morris, S.; Callaghan, A.; Whitehouse, P.; Morritt, D.; Crane, M. 2003. Incorporation of in situ and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides. Water Res., 37(17): 4180–4190. doi:10.1016/s0043-1354(03)00337-3
- Mebane, C. A.; Schmidt, T. S.; Miller, J. L.; Balistrieri, L. S. 2020. Bioaccumulation And Toxicity Of Cadmium, Copper, Nickel, And Zinc And Their Mixtures To Aquatic Insect Communities. Environ. Toxic. and Chem.. 39(4): 812-833. doi:10.1002/etc.4663
- Meis, M.R.M.; Tundisi, J.G. 1986. Geomorfological and limnological processes as a basis for typology. The midle Rio Doce lake system. An. Acad. Bras. Ciênc., 58(1):103-120.
- Mela, M.; Neto, F. F.; Yamamoto, F. Y.; Almeida, R.; Grötzner, S. R.; Ventura, D. F.; Ribeiro, C. A. O. 2014. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Fish Physiol. Biochem. 40:245–256. doi:10.1007/s10695-013-9840-4
- Mendes, L. B.; Mello, F. A.; Chagas, K. R.; Campelo, R. P. M.; Medeiros, L. C. C.; Smith, R. E. W.; Furley, T. H. 2020. Ecotoxicological Assessment of the Doce River Surface Water After the FundãO Dam Collapse. Int. Environ. Ass. & Manag.. 16(5): 608-614. doi:10.1002/ieam.4291
- Mendikute, G. A.; Cajaraville, M. P. 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. Toxicol. in Vitro 17:539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Teixeira, B. C.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V.L.; Agostinho, S. G. N.; Vasconcelos, C. M.; Gomes, L. C. 2022. Seasonality effects on the metal concentration and biochemical changes in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from Doce River after the collapse of the Fundão dam in Mariana, Brazil. Environ. Tox. & Pharm., 89: 103777
- Merçon, J.; Silva Cabral, D.; Chisté Teixeira, B.; Pereira, T. M.; Bona, A. M.; Armini, C. V. L.; Agostinho, S. G. N.; Gomes, L. C. 2021. Evidence of reproductive disturbance in *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characiformes) from the Doce River after the collapseof the Fundão Dam in Mariana, Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res., 28:66643–66655.

- Mogren, C. L.; Webb, S. M.; Walton, W. E.; & Trumble, J. T. 2013. Micro x-ray absorption spectroscopic analysis of arsenic localization and biotransformation in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) and *Culex tarsalis* Coquillett (Culicidae). Environ. Pollu., 180:78–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.021
- Moiseenko, T. I.; Gashkina, N. A. 2020. Distribution and bioaccumulation of heavy metals (Hg, Cd and Pb) in fish: influence of the aquatic environment and climate. Environ. Res. Lett. 15:115013
- Mompelat, S.; Le Bot, B.; & Thomas, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. Environ. Int.,35(5): 803–814. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008
- Monteiro, H. R.; Pestana, J. L. T.; Novais, S. C.; Leston, S.; Ramos, F.; Soares, A. M. V. M.; Devreese, B.; Lemos, M. F. L. 2019b. Assessment of fipronil toxicity to the freshwater midge *Chironomus riparius*: molecular, biochemical, and organismal responses. Aquatic Toxic., 105292. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105292
- Monteiro, H. R.; Pestana, J. L. T.; Novais, S. C.; Soares, A. M. V. M.; Lemos, M. F. L. 2019a. Toxicity of the insecticides spinosad and indoxacarb to the non-target aquatic midge *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ..doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.303
- Montella, I. R.; Schama, R.; Valle, D. 2012. The classification of esterases: animportant gene family involved in insecticide resistance A Review. Mem Inst OswaldoCruz, 107(4): 437-449
- Morais, S. G.; Pesentl, E. C.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. A. 2014. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). Zoologia, 31(4):323–328.
- Morais, G. S.; Vieira, T. B.; Santos, G. S.; Dolatto, R. G.; Cestari, M. M.; Grassi, M. T.; Silva, M. A. N. 2020. Genotoxic, metabolic, and biological responses of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) after exposure to BBP. Sci. of The Tot. Environ., 136937. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136937
- Morais, G. S.; Vieira, T. B.; Santos, G. S.; Baika, L. M.; Cestari, M. M.; Grassi, M. T.; Navarro da Silva, M. A. 2019. Biological, biochemical and genotoxic effects of Sb in the midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae). Ecotoxic. and Environ. Saf., 176: 196–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.03.080
- Moreau, X.; Saez, G.; Thiéry, A.; Clot-Faybesse, O.; Guiraudie-Capraz, G.; Bienboire-Frosini, C.; Martin, C.; De Jong, L. 2008. ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): A biomarker calibration step for in situ monitoring of xenobiotic exposure. Environ. Pollu., 153(3): 574–581. doi:10.1016/j.envpol.2007.09.019
- Mourão, A. O.; Santos, M. S.; da Costa, A. S. V.; Silva, H. T.; Maia, L. F. O.; Faria, M. C. S.; Rodriguez, M. V. R.; Rodrigues, J. L. 2023. Assessment of Health Risk and Presence of Metals in Water and Fish Samples from Doce River, Brazil, After Fundão Dam Collapse. Arch. Env. Cont. Toxic., 84: 377–388. doi:10.1007/s00244-023-00991-6

- Mugnai, R.; Buss, D. F.; Oliveira, R. B.; Sanfins, C.; Carvalho, A. do L.; Baptista, D. F. 2011. Application of the biotic index IBE-IOC for water quality assessment in wadeable streams in south-east Brazil. Acta Limnologica Brasiliensia, 23(1): 74–85. doi:10.4322/actalb.2011.021
- Mulholland, D.; Garnier, J.; Araújo, D.; Duarte, W. C.; Monvoisin.; Quantin, C.; Freydier, R.; Seyler, P. 2022. New insights into metal(loid) dynamics in the Doce Riverestuary (Brazil) after a massive iron ore-processing tailing dam collapse. Environ. Sci. Pollut. Res., 29:43072–43088. doi:10.1007/s11356-021-18101-1
- Muscatello, J. R.; Liber, K. 2009. Accumulation and Chronic Toxicity of Uranium Over Different Life Stages of the Aquatic Invertebrate *Chironomus tentans*. Arch. of Environ. Contam. and Toxic., 57(3): 531–539. doi:10.1007/s00244-009-9283-1
- Nair, P. M. G.; Choi, J. 2011. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. Aquatic Toxic., 101(3-4): 550–560. doi:10.1016/j.aquatox.2010.12.006
- Nath, B. B. 2018. Extracellular hemoglobin and environmental stress tolerance in *Chironomus* larvae. Journal of Limnology. doi:10.4081/jlimnol.2018.1805
- Naz, S.; Hussain, R.; Ullah, Q.; Chatha, A. M. M; Shaheen, A.; Khan, R. U. 2021. Toxic effect of some heavy metals on hematology and histopathology of major carp (Catla catla). Environ Sci Pollut Res 28: 6533–6539. doi:10.1007/s11356-020-10980-0
- NRC (National Research Council). 2003. "Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments". In *Processes, Tools, and Applications*, Washington, DC, USA: National Academy Press.
- Nybom, I.; Abel, S.; Waissi, G.; Väänänen, K.; Mäenpää, K.; Leppänen, M.; Kukkonen, J. V. K.; Akkanen, J. 2016. Effects of Activated Carbon on PCB Bioaccumulation and Biological Responses of *Chironomus riparius* in Full Life Cycle Test. Environ. Sci. Technol. 50(10): 5252–5260
- O'Donnell, M. 2008. Insect Excretory Mechanisms. Advances in Insect Physiology Volume 35: 1–122. doi:10.1016/s0065-2806(08)00001-5
- OECD. 2011. Guidelines for the testing of chemicals. *Chironomus sp.*, Acute ImmobilisationTest. 235. pp.17.
- Oliver, D. R. 1971. Life History of the Chironomidae. Annu. Rev. of Entom., 16(1): 211–230. doi:10.1146/annurev.en.16.010171.001235
- Osmulski, P. A.; Leyko, W. 1986. Structure, function and physiological role of *Chironomus* haemoglobin. Comp. bioch. & phys., 85(4): 701-722.
- Özaslan, M. S.; Demir, Y.; Küfrevioğlu, O. I.; Çiftci, M. 2017. Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Van Lake fish gills. J. of Bioch. and Mol. Toxic., 31(11): e21967. doi:10.1002/jbt.21967

- Palacio-Cortés, A.; Signorini-Souza, I. L.; Hara, E. L. Y.; Disner, R. G.; Rebechi, D.; Grassi, M. T.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. A. 2017. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) effects on *Chironomus sancticaroli* larvae after short-term exposure. Ecotox. and Environ. Saf., 139:308-315
- Palumbo-Roe, B.; Wragg, J.; Banks, V.J. 2012. Lead mobilisation in the hyporheic zone and river bank sediments of a contaminated stream: contribution to diffuse pollution. J Soils Sediments, 12: 1633–1640. doi:10.1007/s11368-012-0552-7
- Pampanin, D. M.; Sydnes, M. O. 2013. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment. In Hydrocarbon (Eds.: V. Kutcherov, & A. Kolesnikov. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/48176
- Park, S. Y.; Choi, J. 2009. Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposurein Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83: 463–468. doi:10.1007/s00128-009-9745-1
- Park, K.; Bang, H. W.; Park, J.; Kwak, I.-S. 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. Chemosphere,77(3): 359–367. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.019
- Park, S.-Y.; Nair, P. M. G.; Choi, J. 2012. Characterization and expression of superoxide dismutase genes in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae as a potential biomarker of ecotoxicity. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 156(3-4): 187–194. doi:10.1016/j.cbpc.2012.06.003
- Park, K.; Kwak, I. 2012. Assessment of Potential Biomarkers, Metallothionein and Vitellogenin mRNA Expressions in Various Chemically Exposed Benthic *Chironomus riparius* Larvae. Ocean Sci. J. 47(4):435-444
- Park, K.; Kwak, I. S. 2020. Cadmium-induced developmental alteration and upregulation of serine-type endopeptidase transcripts in wild freshwater populations of *Chironomus plumosus*. Ecotox. and Environ. Safety, 192: 110240. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110240
- Passos, L. S.; Gnocchi, K. G.; Pereira, T. M.; Coppo, G. C.; Cabral, D. S.; Gomes, L. C. 2020. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? Sci. of The Tot.Environ., 736: 139644. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139644
- Pasteur, N.; Nancé, E.; Bons, N. 2001. Tissue Localization of Overproduced Esterasesin the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. of Med. Entom., 38(6):791–801.
- Pauly, G. F. E.; Cruz, A. C. F.; Treviani, T. H.; Kim, B. S. M.; Perina, F. C.; Yamamoto, F. Y.; Figueira, R. C. L.; Abessa, D. M. S. 2023. Spatial-temporal variations of metals and arsenic in sediments from the Doce River after the Fundão dam rupture and their bioaccumulation in Corbicula fluminea. Integ. Environ. Assess. and Manag., 1:12

- Petrović, M.; Eljarrat, E.; López de Alda, M. J.; & Barceló, D. 2001. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. TrAC Trends in Anal. Chem., 20(11): 637–648. doi:10.1016/s0165- 9936(01)00118-2
- Pettigrove, V.; Hoffmann, A. 2005. A field-based microcosm method to assess the effects of polluted urban stream sediments on aquatic macroinvertebrates. Environ. Toxic. and Chem., 24(1): 170. doi:10.1897/03-459.1
- Pierson, M. 1956. Contribution a l'histologie de l'appareil digestif de Chironomous plumosus L Annls Sci. nut. Zool., 11: 107-122
- Pillot, H. K. M. M. Chironomidae Larvae of the Netherlands and adjacent lowlands: biology and ecology of the Chironomini. KNNV Publishing, Zeist, 2009. pp. 270.
- Pinder, L. C. V. 1986. Biology of Freshwater Chironomidae. An. Rev. of Entom., 31(1): 1–23. doi:10.1146/annurev.en.31.010186.000245
- Pinho, L.C. 2008. Diptera. In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo. Froehlich, C.G. (org.). Disponível em: <a href="http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline">http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/guiaonline</a>. 2008>
- Planelló, R.; Servia, M. J.; Gómez-Sande, P.; Herrero, O.; Cobo, F.; Morcillo, G. 2015. Transcriptional Responses, Metabolic Activity and Mouthpart Deformities in Natural Populations of *Chironomus riparius* Larvae Exposed to Environmental Pollutants. Environ. Toxic. 30(4):383-395.
- Pourang, N. 2021. Heavy Metals in Freshwater Invertebrates of Iran: A Review on the Bioaccumulation and Effects. In: Jawad, L.A. (eds) Tigris and Euphrates Rivers: Their Environment from Headwaters to Mouth. Aquatic Ecology Series, vol 11. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-57570-0 67
- Printes, L. B.; Fernandes, M. N.; Espíndola, E. L. G. 2011. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. Ecotox. and Environ. Saf., 74(3): 424–430. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.033
- Printes, L. B.; Espíndola, E. L.G.; Fernandes, M. N. 2007. Biochemical Biomarkers in Individual Larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 2(1):53-60.
- Purać, J.; Čelić, T. V.; Vukašinović, E. L.; Đorđievski, S.; Milić, S.; Ninkov, J.; Kojić, D. 2021. Identification of a metallothionein gene and the role of biological thiols in stress induced by short-term Cd exposure in Ostrinia nubilalis. Comp. Bioc. Phis. C: Toxic. Pharm., 250: 109148
- Qi, H.; Li, H.; Ma, P.; You, J. 2015. Integrated sediment quality assessment through biomarker responses and bioavailability measurements: Application in Tai Lake, China. Ecotox. and Environ. Saf., 119: 148–154. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.05.007

- Quadra, G. R.; Roland, F.; Barros, N.; Malm, O.; Lino, A. S.; Azevedo, G. M.; Thomaz, J. R.; Andrade-Vieira, L. F.; Praça-Fontes, M. M.; Almeida, R. M.; Mendonça, R. F.; Cardoso, S. J.; Guida, Y. S. Campos, J. M. S. 2018. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.104
- Quaresma, V. S.; Catabriga, G.; Bourguignon, S. N.; Godinho, E. & Bastos, A. C. 2015. Modern sedimentary processes along the Doce river adjacent continental shelf. Braz. Journ. of Geol., 45(4): 635-644
- Rabdodonirina, S.; Net, S.; Ouddane, B.; Merhaby, D.; Dumoulin, D.; Popescu, T.; Ravelonandro, P.2015. Distribution of persistent organic pollutants (PAHs, Me-PAHs, PCBs) in dissolved, particulate and sedimentary phases in freshwater systems. Environmental Pollution, 206: 38–48. doi:10.1016/j.envpol.2015.06.023
- Rakotondravelo, M. L.; Anderson, T. D.; Charlton, R. E.; Zhu, K. Y. 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Arch. of Environ. Contam. and Toxic., 51(3):360–366.
- Ramos, R. L.; Lebron, Y. A. R.; Moreira, V. R.; Santos, L. V. S.; Amaral, M. C. S. 2021. Phenolic compounds in surface water: methodology and occurrence in Doce River, Brazil. Environ. Monit. Assess., 193: 687. doi:10.1007/s10661-021-09420-4
- Rebechi, D., Richardi, V. S., Vicentini, M., Guiloski, I. C., Assis, H. C. S., Navarro-Silva, M. A. 2014. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. Rev. Bras. entomol. 58(3):296–301.
- Rebechi, D.; Palacio-Cortés, A. M.; Richardi, V. S.; Beltrão, T.; Vicentini, M.; Grassi, M. T.; da Silva, S. B.; Alessandre, T.; Hasenbein, S.; Connon, R.; Navarro-Silva, M. A. 2021. Molecular and biochemical evaluation of effects of malathion, phenanthrene and cadmium on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) larvae. Ecotox. and Environ. Saf., 211: 111953. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.111953
- Reboita, M.; Rodrigues, M.; Silva, L.; Alves, M. 2015. Aspectos climáticos do estado de Minas Gerais (climate aspects in Minas Gerais state). Rev. Bras. De Clima., 17. 10.5380/abclima.v17i0.41493.
- Rey, D.; Long, A.; Pautou, M.P.; Meyran, J.C. 1998. Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Entom. Experim. et App., 88:255–63.
- Rey, D.; Pautou, M.P.; Meyran, J.C. 1999. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. Journ. of Invert. Path., 73:173-181.
- Richard, C.; Canonica, S. 2005. Aquatic Phototransformation of Organic Contaminants Induced by Coloured Dissolved Natural Organic Matter. In: Boule, P., Bahnemann, D.W., Robertson, P.K.J. (eds) Environmental Photochemistry Part II. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 2M. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/b138187

- Richardi, V. S.; Rebechi, D.; Aranha, J. M. R.; & Navarro-Silva, M. A. 2013. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. Zoologia, 30(2): 211–216. doi:10.1590/s1984-46702013000200011
- Richardi, V. S.; Vicentini, M.; Rebechi, D.; Fávaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2015. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). Rev. Bras. de Entom.. 59: 240-250.
- Richardi, V. S.; Vicentini, M.; Morais, G. S.; Rebechi, D.; da Silva, T. A.; Favaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2018. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) Environ. Pollu. 242:277-287.
- Richmond, R., Gilbert, D., Sheehan, K., Gromko, M., & Butterworth, F. 1980. Esterase 6. and reproduction in *Drosophila melanogaster*. Science, 207(4438): 1483–1485. doi:10.1126/science.6767273
- Rocha, G. M.; Salvador, B.; Laino, P. S.; Santos, G. H. C.; Demoner, L. E.; Conceição, L. R.; Teixeira-Amaral, P.; Mill, G. N.; Ghisolfi, R. D.; Costa, E. S.; Longhini, C. M.; da Silva, C. A.; Cagnin, R. C.; Sá, F.; Neto, R. R. Junior, C. D. Oliveira, K. S.; et al. Fernandes, L. F. L. 2022. Responses of marine zooplankton indicators after five yearsof a dam rupture in the Doce River, Southeastern Brazil. Sci. of The Tot. Environ., 806: 151249.
- Rodrigues, A. C. M.; Gravato, C.; Quintaneiro, C.; Barata, C.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2015a. Sub-lethal toxicity of environmentally relevant concentrations of esfenvalerate to *Chironomus riparius*. Environ. Pollut., 207: 273–279. doi:10.1016/j.envpol.2015.09.035
- Rodrigues, A. C. M.; Gravato, C.; Quintaneiro, C.; Golovko, O.; Žlábek, V.; Barata, C.; Soares, A. M. V. M.; Pestana, J. L. T. 2015b. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. Sci. of The Tot. Environ., 508: 506–513. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.021
- Rodrigues, A. S. D. L.; Malafaia, G.; Costa, A. T.; Nalini Jr., H. A. 2014. Iron ore mining promotes iron enrichment in sediments of the Gualaxo do Norte River basin, Minas Gerais State, Brazil. Environ. Earth Sci., 71: 4177–4186. doi:10.1007/s12665-013-2808-y
- Rosen, M. R.; Van Metre, P. C. 2010. Assessment of multiple sources of anthropogenicand natural chemical inputs to a morphologically complex basin, Lake Mead, USA. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol 294:30–43
- Rosière C. A.; Chemale Jr. F. 2000. Itabiritos e minérios de ferro de alto teor do Quadrilátero Ferrífero Uma visão geral e discussão. *Geonomos*, 8(2):27-43. doi: 10.18285/geonomos.v8i2.155

- Rosière C. A; Spier C. A.; Rios F. J.; Suckau V. E. 2008. The itabirites of the Quadrilátero Ferrífero and related high-grade iron ore deposits: An overview. *In: Iron Formation-Related High-Grade Iron Ore* Banded. (Eds.: *Hagemann S., Rosière C.A., Gutzmer J., Beukes N.J.*). Soc. of Econ. Geo., Inc. Reviews in Economic Geology, 15:223-254.
- Saez, G.; De Jong, L.; Moreau, X.; Sarrazin, L.; Wafo, E.; Schembri, T.; Lagadec, V.; Diana, C.; Monod, J-L.; Thiéry, A. 2008. Evaluation of pollutant exposure by chemicaland biological markers in a Mediterranean French urban stream: A step for in situ calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. Environ. Res., 107(3): 351–361. doi:10.1016/j.envres.2008.01.003
- Saffarini, D. A.; Trewitt, P. M.; Luhm, R. A.; Bergtrom, G. 1991. Differential regulation of insect globin and actin mRNAs during larval development in *Chironomus thummi*. Gene 101: 215–222.
- Samarco. 2006. Atualização do Plano de Recuperação Ambiental Integrado. Disponível em <a href="https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/01/prai\_renova\_jan17\_rev03.pdf">https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/01/prai\_renova\_jan17\_rev03.pdf</a> Acessado em: 25/05/2023
- Santolin, C. V. A.; Ciminelli, V. S. T.; Nascentes, C. C.; Windmoller, C. C. 2015. Distribution and environmental impact evaluation of metals in sediments from the Doce River Basin, Brazil. Environ. Earth Sci., 74: 1235–1248. doi:10.1007/s12665-015-4115-2
- Santos, O. S. H.; Avellar, F. C.; Alves, M.; Trindade, R. C.; Menezes, M. B.; Ferreira, M. C.; França, G. S.; Cordeiro, J.; Sobreira, F. G.; Yoshida, I. M.; Moura, P. M.; Scotti, M. R. 2019. Understanding the environmental impact of a mine dam rupture in Brazil: Prospects for remediation. Jour. of Environ. Qual., 48: 439–449. https://doi.org/10.2134/Jeq2018.04.0168
- Santos, M. P. O.; Santos, M. V. N.; Matos, R. S.; Van Der Mass, A. S.; Faria, M. C. S.; Batista, B. L.; Rodrigues, J. L.; Bomfeti, C. A. 2022. Pleurotus strains with remediation potential to remove toxic metals from Doce River contaminated by Samarco dam mine. Int. J. Environ. Sci. Technol., 19: 6625–6638.doi:10.1007/s13762-021-03597-4
- Schin, K.; Laufer, H.; Carr, E. 1977. Cytochemical and electrophoretic studies of haemoglobin synthesis in the fat body of a midge, Chironomus thummi. Journal Insect Physiology 23: 1233-1242.
- Seehuus, S. C.; Norberg, K.; Gimsa, U.; Krekling, T.; Amdam, G.V. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:962–967.
- Seidman, L. A.; Bergtrom, G.; Gingrich, D. J.; Remsen, C. C. 1986. Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*. Tissue and Cell, 18(3): 395–405. doi:10.1016/0040-8166(86)90059-5
- Servia, M. J.; Péry, A. R. R.; Heydorff, M.; Garric, J.; Lagadic, L. 2006. Effects of copperon energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. Ecotoxicology, 15(3): 229–240. doi:10.1007/s10646-005-0054-0

- Sharma, V.J.; Satyanarayan, S. 2011. Effect of selected heavy metals on the histopathology of different tissues of earthworm Eudrillus eugeniae. Environ Monit Assess, 180(1-4):257–267. doi:10.1007/s10661-010-1786-8
- Shingleton, A. W. 2005. Body-size regulation: combining genetics and physiology. Curr. Biol., 15: R825–R827
- Signorini-Souza, I. L.; Palacio-Cortés, A. M.; Beltrão-Graboski, T.; Richardi, V. S.; Fávaro, L. F.; Navarro-Silva, M. A. 2020. Cell demage induced by polybrominated diphenyl ethers on Chironomus sancticaroli (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras. Entom. 64(1): e201950.
- Silva de Assis, H. C. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen. Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 1998.
- Silva, C.; Wanderley-Teixeira, V.; Cunha, F.; Oliveira, J.; Dutra, K.; Navarro, D. F.; Teixeira, A. 2017. Effects of citronella oil (Cymbopogon winterianus Jowitt ex Bor) on Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) midgut and fat body. Biotechnic & Histochemistry, 1–13.
- Silva, D. de C.; Bellato, C. R.; Marques Neto, J. de O.; Fontes, M. P. F. 2018. Trace elements in river waters and sediments before and after a mining dam breach (Bento Rodrigues, Brazil). Quim. Nova, 41(8): 857–866. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170252
- Silva, C. J. M.; Silva, P. A. L.; Campos, D.; Machado, A. L.; Pestana, J. L.; Gravato, C. 2021. Oxidative damage and decreased aerobic energy production due to ingestion of polyethylene microplastics by *Chironomus riparius* (Diptera) larvae J. Hazard. Mater, 402:123775. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123775
- Skowronek, P.; Wójcik, L.; Strachecka, A. 2021. Fat body Multifunctional Insect Tissue. Insects. 12(6): 547. doi:10.3390/insects12060547
- Slobodian, M. R.; Petahtegoose, J. D.; Wallis, A. L.; Levesque, D. C.; Merritt, T. J. 2021. The Effects of Essential and Non-Essential Metal Toxicity in the Drosophila melanogaster Insect Model: A Review. Toxics, 9(10): 269. doi: 10.3390/toxics9100269
- Smock, L. A. 1983. Relationships between metal concentrations and organism size in aquatic insects. Fresh. Biol., 13(4): 313–321. doi:10.1111/j.1365- 2427.1983.tb00683.x
- Somparn, A.; Iwai, C. B.; Noller, B. N. 2017. Assessment of pesticide contaminated sediment using biological response of tropical chironomid, *Chironomus javanus* Kifferas biomarker. As. Pac. J. of Trop. Biomed., 7(8): 719–724. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.014
- Somparn, A.; Iwai, C. B.; Noller, B. 2015. Potential use of acetylcholinester-ase, glutathione-S-transferase and metallothionein for assessment of contaminated sediment in tropical chironomid, *Chironomus javanus*. J. Environ. Biol., 36:1355-1359
- Song, W. Y.; Park, J.; Eisenach, C.; Maeshima, M.; Lee, Y.; Martinoia, E. 2014. ABC Transporters and Heavy Metals. In: Geisler, M. (eds) Plant ABC Transporters. Signaling and Com. in Plants, vol 22. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-06511-3

- Stegeman, J. J.; Brouwer, M.; Di Giulio, R. T.; Förlin, L.; Fowler, B. A.; Sanders, B. M.; van Veld, P. A. 1992, Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. In: R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle Jr. and H. L Bergman (eds.). Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Stojanović, J.; Miloševi, D. D.; Vitorović, J. S.; Savić Zdravković, D. N.; Stanković, N. R.; Stanković, J. B.; Vasiljević, P. J. 2021. Histopathology of Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) exposed to metal oxide nanoparticles. Arch Biol Sci. 73(3):319-329
- Strixino, G.; Strixino, S. T. 1985. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras. Zool. [online]. 3(4):177-180. doi:10.1590/S0101-81751985000400003.
- Sturm, A.; Hansen, P.-D. 1999. Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. Ecotox. and Environ. Saf., 42(1): 9–15. doi:10.1006/eesa.1998.1721
- Sumi, Y.; Suzuzki, T.; Yamamura, M.; Hatakeyama, S.; Sugaya, Y.; Suzuki, K. T. 1984. Histochemical staining of cadmium taken up by the midge larva, Chironomus yoshimatsui (diptera, chironomidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 79(3): 353–356. doi:10.1016/0300-9629(84)90526-7
- Tao, Y.; Yuan, Z.; Xiaona, H.; Wei, M. 2012. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and potential health risk assessment from Taihu lake, China. Ecotoxicology and Environmental Safety, 81: 55–64. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.04.014
- Taylor, K. G.; Owens, P. N. 2009. Sediments in urban river basins: a review of sediment—contaminant dynamics in an environmental system conditioned by human activities. J. of Soils and Sediments, 9(4): 281–303. doi:10.1007/s11368-009-0103-z
- Thomaidi, V. S.; Stasinakis, A. S.; Borova, V. L.; Thomaidis, N. S. 2015. Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. Journal of Hazardous Materials, 283: 740–747. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.023
- Thomann, R. V.; Komlos, J. 1999. Model of biota-sediment accumulation factor for polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Toxic. and Chem., 18(5): 1060–1068. doi:10.1002/etc.5620180534
- Tokhun, N.; Iwai, C. B.; Noller, B. N. 2017. Metal Concentrations and Responses of Chironomid Larvae Exposed to Thailand Pulp and Paper Mill Effluent. Bull. of Environ. Contam. and Toxic., 99(5): 548–554. doi:10.1007/s00128-017-2166-7
- Toušová, Z.; Kuta, J.; Hynek, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Bláha, L.; Hilscherová, K. 2016. Metallothionein modulation in relation to cadmium bioaccumulation and age- dependent sensitivity of *Chironomus riparius* larvae. Environ. Sci. and Pollu. Res., 23(11): 10504–10513. doi:10.1007/s11356-016-6362-5

Trivinho-Strixino, S. 2011. Larvas de Chironomidae. Guia de Identificação. São Carlos, Depto Hidrobiologia/Lab. Entomologia Aquática/UFScar, pp. 371.

Trivinho-Strixino, S.; STRIXINO, G. 1982. Ciclo de vida de Chironomus sancticaroli Strixino & Strixino, (Diptera, Chironomidae). Rev. Bras. de Entom., 26(2):183-189.

Trivinho-Strixino, S.; Strixino, G. 1989. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região Neotropical (Diptera: Chironomidae). Rev. Bras.de Entom., 33 (2): 207-216.

Turcherro, M.; Diotto, A.; Tallandini, L. 1981. In vitro study of esterase inhibition in the midge *Chironomus thummi* Kieff. (Diptera, Chironomidae). Boll. Z00I. 48: 335-339.

Vafopoulou-Mnadalos, X.; Laufer, H. 1984. Tissue-Specificity of Hemoglobin Synthesis: localization of Heme Synthesis in the Subepidermal Fat Body of Chironomus thummi (Diptera). Archives of insect Biochemistry and Physiology 191- 197

Valle, D.; Montella, I. R. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 1(1):128, 2006.

Van Praet, N.; De Jonge, M.; Stoks, R.; Bervoets, L. 2014. Additive effects of predator cues and dimethoate on different levels of biological organisation in the non-biting midge *Chironomus riparius*. Aquatic Toxic., 155: 236–243. doi:10.1016/j.aquatox.2014.07.001

Vasconcelos-Teixeira, R.; Titon, S. C. M.; Titon-Jr, B.; Pompêo, M. L. M.; Gomes, F. R.; Assis, V. R. 2022. Stress Response, Immunity, and Organ Mass in Toads (*Rhinella diptycha*) Living in Metal-Contaminated Areas. Biol. Trace Element Res., 200: 800-811.

Vaseli, M.; Rožman, M.; Vilenica, M.; Petrović, M.; Previšić, A. Bioaccumulation and bioamplification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in aquatic insects. Sci. of the Tot. Environ., 838(2): 156208. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156208.

Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E.; Blasco, J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Am. J. Physiol., 277:1612-1619

Vicentini, M.; Morais, G. S.; Rebecchi-Baggio, D. R.; Richardl, V. S.; Santos, G. S.; Cestari, M. M.; Navarro-Silva, M. 2017. Benzo (a) pyrene Exposure Causes Genotoxicand Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). Neot. Entom., 46:665-658.

Vieira, C. E. D.; Costa, P. G.; Lunardelli, B.; Oliveira, L. F.; Cabrera, L. C.; Risso, W. E.; Primel, E. G.; Melettl, P. C.; Fillmann, G.; Martinez, C. B. R. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. Sci. of the Tot. Environ., 542:44-56.

- Vieira, C. E. D.; Marques, J. A.; da Silva, N. G.; Bevitório, L. Z.; Zebral, Y. D.; Maraschi, A. C.; Costa, S. R.; Costa, P. G.; Damasceno, E. M.; Pirovani, J. C. M.; Vale-oliveira, M.; Souza, M. M.; Martins, C. M. G.; Bianchini, A.; Sandrini, J. Z. 2022. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. Sci. of the Tot. Environ., 832: 154878.
- Vos, R. M. E.; Van Bladeren, P. J. 1990. Glutathione S-transferases in relation to theirrole in the biotransformation of xenobiotics. Chemico-Biological Interactions, 75(3): 241–265. doi:10.1016/0009-2797(90)90069-y
- Wallace, W. G.; Lee, B. G.; Luoma, S. N. 2003. The subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. The significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically-detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Prog. Ser., 249: 183–197.
- Wang, L.; Song, L.; Ni, D.; Zhang, H.; Liu, W. 2009. Alteration of metallothionein mRNAin bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 149:50-57
- Wang, W. X. 2013. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. Chin. Sci. Bull., 58:194–202
- Wang, W. X.; Rainbow, P. S. 2013. Subcellular Partitioning and the Prediction of Cadmium Toxicity to Aquatic Organisms. Environmental Chemistry, 3(6): 395. doi:10.1071/en06055
- Warren, N.; Allan, I. J.; Carter, J. E.; House, W. A.; Parker, A. 2003. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review. Ap. Geoc., 18(2): 159–194. doi:10.1016/s0883-2927(02)00159-2
- Weber, R.E., Vinogradov, S.N. 2001. Non-vertebrate hemoglobins: function and molecular adaptation. Physiol. Rev. v. 81, pp. 569-628
- Weber, A. A.; Sales, C. F.; de Souza Faria, F.; Melo, R. M. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. Ecotox. and Environ. Saf., 190: 110165. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110165
- Xie, L.; Flippin, J. L.; Deighton, N.; Funk, D. H.; Dickey, D. A.; Buchwalter, D. B. 2009. Mercury (II) Bioaccumulation and Antioxidant Physiology in Four Aquatic Insects. Environ. Sci. & Tech., 43(3): 934–940. doi:10.1021/es802323r
- Xie, Z.; Gan, Y.; Tang, J.; Fan, S.; Wu, X.; Li, X.; Cheng, H.; Tang, J. 2020. Combined effects of environmentally relevant concentrations of diclofenac and cadmium *on Chironomus riparius* larvae. Ecotox. Environ. Saf., 202: 110906. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110906
- Xu, Z-B.; Zou, X-P.; Zhang, N.; Feng, Q-L.; Zheng, S-C. 2015. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera* litura. Insect Science, 22: 503–511

- Yamamoto, F. Y.; Souza, A. T. C.; de Paula, V. C. S.; Beverari, I.; Garcia, J. R. E.; Padial, A. A.; Abessa, D. M. S. 2022a. From molecular endpoints to modeling longer-term effects in fish embryos exposed to the elutriate from Doce River. Sci. os the Tot. Environ., 846: 157332.
- Yamamoto, F. Y.; Pauly, G. E.; Nascimento, L. S.; Fernandes, G. M.; Santos, M. P.; Kim.; Carvalho, M. U.; Figueira, R. C. L.; Cavalcante, R. M.; Grassi, M. T.; Abessa, M. T. 2022b. Chemical data of contaminants in water and sediments from the Doce River years after the mining dam collapse disaster. 45:108715. doi: 10.1016/j.dib.2022.108715.
- Yamamoto, F. Y., Onishi, K., Ralha, T. R., Silva, L. F. O., Deda, B., Pessali, T. Y. C., Souza, C., Oliveira Ribeiro, C. A., & Abessa, D. M. S. 2023a. Earlier biomarkers infish evidencing stress responses to metal and organic pollution along the Doce RiverBasin. Environ.I Pollu., *329*, 121720. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.121720
- Yamamoto, F. Y.; Pauly, G. F. E.; Nascimento, L. S.; Fernandes, G. M.; Santos, M. P.; Figueira, R. C. L.; Cavalcante, R. M.; Grassi, M. T.; Abessa, D. M. S. 2023b. Explaining the persistence of hazardous chemicals in the Doce River (Brazil) by multiple sourcesof contamination and a major environmental disaster. J. of Haz. Mat. Adv., 9: 100250. https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100250
- Zhang, L.; Yang, J.; Li, H.; You, J.; Chatterjee, N.; Zhang, X. 2019. Development of the transjicriptome for a sediment ecotoxicological model species, *Chironomus dilutus*. Chemosphere, 125541. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125541
- Zheng, X.; Xu, Z.; Qin, G.; Wu, H.; Wei, H. 2017. Cadmium exposure on tissue-specific cadmium accumulation and alteration of hemoglobin expression in the 4th-instar larvae of Propsilocerus akamusi (Tokunaga) under laboratory conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety. 144: 187-192.
- Zheng, X.; Cheng, W.; Ji, C.; Zhang, J.; Yin, M. 2020. "Detection of metal ions in biological systems: A review". Rev. in Analy. Chem., 39(1):231-246. doi:10.1515/revac-2020-0118
- Zorzal-Almeida, S.; Fernandes, V. de O. 2021. Ecological thresholds of periphytic communities and ecosystems integrity in lower Doce River basin. Sci. of The Tot.Environ., 796: 148965. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148965
- Zoumis, T.; Schmidt, A.; Grigorova, L.; Calmano, W. 2001. Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. Sci. of The Tot. Environ., 266(1-3): 195–202. doi:10.1016/s0048-9697(00)00740-3

## **MATERIAL SUPLEMENTAR**

## Capítulo I

Tabela S1. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
С	-3.5261	-0.9209
GUA	3.4918	-3.4265
CAN	2.992	0.1686
NAQ	2.3742	2.2084
С	-3.5586	-1.0606
REF	-1.3541	0.8863
GOV	0.70683	1.5333
AIM	-1.126	0.61124

Tabela S2. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* das variáveis inorgânicas bioconcentradas nas larvas.

	PC 1	PC 2
Ва	0.23188	-0.3594
Ca	0.1643	0.3666
Cd	0.1861	-0.1046
Cr	0.2991	0.2421
Cu	0.2880	0.1159
Fe	0.3424	-0.0680
K	0.2309	-0.2380
Li	0.3128	0.0647
Mg	0.1750	0.3093
Mn	0.2288	-0.3853
Na	0.3136	-0.1761
Р	-0.3157	-0.0041
Pb	0.1210	0.2822
S	0.1125	0.4134
Se	0.2478	-0.1804
Zn	-0.2717	-0.1719

Tabela S3. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
GUA	-4.638	2.0637
CAN	0.2139	-0.3710
NAQ	0.2006	-0.6659
REF	3.1646	1.1932
GOV	2.2493	0.9783
AIM	-1.1905	-3.1984

Tabela S4. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* das variáveis inorgânicas nas amostras de sedimento.

	PC 1	PC 2
Al	0.3367	0.1249
As	-0.2653	0.3081
Cd	-0.2313	0.4080
Cr	0.2045	0.0930
Cu	0.1626	0.3236
Fe	-0.2485	0.3810
Hg	-0.2902	0.2747
Mn	-0.2935	0.3074
Ni	0.1031	0.1265
Pb	0.2236	0.3299
Sc	0.3337	0.1471
Ti	0.3189	0.1529
V	0.3310	0.1664
Zn	0.2807	0.3109

Tabela S5. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
GUA	-3.5883	-0.1605
CAN	<b>-</b> 2.3154	-0.3872
NAQ	4.3427	2.5074
REF	-2.6894	1.3587
GOV	4.9527	-1.9519
AIM	-0.7023	-1.3665

Tabela S6. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos hidrocarbonetos policíclicos armáticos nas amostras de sedimento.

	PC 1	PC 2
Naf	-0.1242	0.0005
1MNaf	-0.1267	-0.0281
2MNaf	-0.1733	0.1778
Aci	0.2455	-0.1193
Ace	0.1815	-0.0413
FI	0.2165	0.2620
DBT	0.2101	0.0462
Fen	0.2462	0.2075
Ant	0.2488	0.1969
Fltr	0.2269	0.2927
Pir	0.2404	0.2428
BeP	0.2648	-0.0347
BaP	0.1533	0.4391
IcdP	0.2428	-0.2347
DahA	0.2379	-0.2437
BghiP	0.2408	-0.2427
BaA	0.2644	0.0603

Cri	0.2536	-0.151	
Per	0.0329	0.4037	
BbF	0.2348	-0.2713	
BkF	0.2541	-0.1539	

Tabela S7. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e scores dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
GUA	-2.0587	-0.10812
CAN	-0.0794	0.20661
NAQ	0.1823	1.6307
REF	-0.0452	-1.1168
GOV	3.1665	-0.29265
AIM	-1.1655	-0.3197

Tabela S8. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos piretroides nas amostras de sedimento.

	PC 1	PC 2
PER	0.42901	0.2069
CYF	0.54622	-0.06436
CYP	0.33074	0.78057
DEL	0.40377	-0.56027
BIF	0.49515	-0.17278

Tabela S9. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
GUA	-6.503	2.972
CAN	-1.821	-0.700
NAQ	4.240	2.839
REF	-1.036	-6.056
GOV	6.845	0.183
AIM	-1.700	0.791

Tabela S10. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos contaminantes (metais, metaloides, piretroides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e matéria orgânica nas amostras de sedimento.

,	PC 1	PC 2
As	-0.11894	0.16929
Cd	-0.10752	0.11942
Cr	0.21506	0.032882
Cu	0.087685	-0.07461
Mn	-0.15105	0.14351
Ni	0.12193	0.059856
Pb	0.040062	-0.24937
Sc	0.096668	-0.28995
Ti	0.068947	-0.30792
V	0.11022	-0.25758
Zn	0.12636	-0.19861
Fe	-0.125	0.1184
Hg	-0.16129	0.11772
ΑĬ	0.12217	-0.2637
PER	0.15747	-0.10037
CYF	0.1805	-0.04611
CYP	0.18853	0.13178
DEL	0.1338	-0.22669
BIF	0.15951	0.008954
OrgMatter	0.069102	-0.28923
Naf	-0.14627	0.1272
1MNaf	-0.15153	0.1449
2MNaf	-0.12309	-0.12671
Aci	0.20358	0.075631
Ace	0.11888	0.14284
FI	0.1922	-0.02218
DBT	0.15347	0.17706
Fen	0.2016	0.077687
Ant	0.1863	0.13941
Fltr	0.16521	0.13862
Pir	0.17811	0.13758
BeP	0.20203	0.13242
BaP	0.098188	0.13709
IcdP	0.19478	0.090284
DahA	0.19757	0.073203
BghiP	0.19703	0.080931
BaA	0.20453	0.12561
Cri	0.21163	0.069176
Per	0.065398	-0.20985
BbF	0.18862	0.087203
BkF	0.19643	0.11769

Tabela S11. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2	PC 3
GUA	-5.9375	-1.424	3.7587
CAN	-1.9484	0.0108	-2.1416
NAQ	3.8247	-2.6778	0.5779
REF	-0.3628	6.1891	-0.06
GOV	6.4247	-0.1071	1.3817
AIM	-2.0007	<b>-</b> 2.081	-3.5167

Tabela S12. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos contaminantes (metais, metaloides, piretroides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e matéria orgânica nas amostras de sedimento e os parâmetros biológicos.

	PC 1	PC 2	PC 3
Al	0.13282	0.24637	-0.01928
As	-0.11729	-0.09693	0.25632
Cd	-0.09996	-0.02951	0.34219
Cr	0.21403	-0.02522	0.09464
Cu	0.092007	0.095821	0.12146
Fe	-0.11736	-0.03021	0.32799
Hg	-0.15589	-0.04514	0.25652
Mn	-0.14597	-0.06382	0.28285
Ni	0.11759	-0.05448	0.051286
Pb	0.056545	0.2741	0.13556
Sc	0.10795	0.27044	-0.03451
Ti	0.080734	0.28679	-0.04785
V	0.11856	0.23609	-0.04084
Zn	0.13878	0.21776	0.13557
PER	0.15396	0.056108	-0.13585
CYF	0.17823	0.029152	-0.00072
CYP	0.18475	-0.11706	0.10157
DEL	0.14318	0.21445	0.012938
BIF	0.15882	-0.00081	0.10155
OrgMatter	0.082014	0.27793	-0.00271
Naf	-0.1399	-0.4606	0.2934
1MNaf	-0.1467	-0.0672	0.2762
2MNaf	-0.1164	0.1942	0.2013
Aci	0.2011	-0.0625	0.1198
Ace	0.1071	-0.1830	-0.1434
FI	0.1962	0.0361	0.1101
DBT	0.1488	-0.1435	0.1729
Fen	0.1989	-0.0713	0.0728
Ant	0.1817	-0.1281	0.0854
Fltr	0.1608	-0.1285	0.0689
Pir	0.1735	-0.1282	0.0724
BeP	0.1946	-0.1402	0.0212
BaP	0.0945	-0.1265	0.0424
IcdP	0.1883	-0.1008	0.0209

DahA	0.1926	-0.0766	0.0537
BghiP	0.1913	-0.0876	0.0387
BaA	0.1997	-0.1177	0.0848
Cri	0.20714	-0.07249	0.054199
Per	0.076658	0.20328	-0.00759
BbF	0.18163	-0.10211	0.002381
BkF	0.18835	-0.13325	-0.00633
Larvas	-0.09206	-0.21901	-0.20007
Pupas	0.077291	0.2139	0.17246
Adultos	-0.04816	0.000515	-0.1574
Sobrevivência	-0.09264	-0.18634	-0.20375

Tabela S13. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

PC.1

PC.2

	PC 1	PC 2
GUA	-5.9375	-1.424
CAN	-1.9484	0.0108
NAQ	3.8247	-2.6778
REF	-0.3628	6.1891
GOV	6.4247	-0.1071
AIM	-2.0007	-2.081

Tabela S14. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos contaminantes (metais, metaloides, piretroides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e matéria orgânica nas amostras de sedimento e os parâmetros biológicos.

	PC 1	PC 2
Al	0.20931	0.32138
Ва	0.20449	-0.26793
Ca	0.017381	0.4118
Cd	0.32466	0.090056
Cr	0.197	0.3007
Cu	0.26201	0.24912
Fe	0.31481	0.036427
K	0.24451	0.008515
Li	0.26985	0.019096
Mg	0.020023	0.20374
Mn	0.21537	-0.25758
Na	0.33116	-0.04539
Р	-0.28778	0.23346
Pb	0.055672	0.34845
S	-0.29694	0.19952
Se	0.16308	-0.19096
Zn	0.030873	0.22462
Larvas	0.12127	-0.14461
Pupas	-0.23412	-0.08986
Adultos	0.18678	0.1019
Sobrevivência	0.083687	-0.2026

Tabela S15. Trabalhos realizados no Rio Doce e entornos com diferentes organismos após o rompimento da Barragem do Fundão (2015).

Organismo	Exposição	Tempo	Efeito	Referência
Allium cepa	In loco	Crônico	Danos em DNA e micronúcleos	Segura et al., 2016
Comunidades bênticas marinhas	In loco	2 períodos após o desastre	Comunudade microbial	Matthews- Cascon et al., 2018
Allium cepa	Àgua coletada no Rio Doce	24 h	Alterações nos índices mitóticos e de fase e aumento nas aberrações Cromossômicas	Quadra et al., 2018
Peixe de água doce (Geophagus brasiliensis)	Àgua coletada no Rio Doce	96 h	Aumento no número de micronúcleos no eritrócito	Gomes et al., 2018
Microbioma de água doce	In loco	3 períodos após o desastre	Comunidade microbial	Cordeiro et al., 2018
Peixe de água doce (Astyanax lacustris)	Elutriado e água	Subcrônico	Inibição de AChE, bioacumulação de metais	Passos et al., 2020
Peixes de água doce (Hoplias intermedius e Hyposto mus affinis)	In loco	Crônico	Metalotioneina, CYP1A, CAT, SOD, Histopatologias	Weber et al., 2020
Peixes de água doce	In loco	Crônico	Concentração de metais no músculo	Ferreira et al., 2020
Peixes estuarinos	In loco	Crônico	Comunidade e população	Andrades et al., 2020
Microbioma	In loco	2 periodos após o desastre	Diversidade, abundância e estrutura	Giongo et al., 2020
Zooplancton marinho	In loco	Agudo – coleta 5 dias após o rejeito chegar ao oceano	Abundância e diversidade	Fernandes et al., 2020
Peixe de água doce (Astyanax lacustris)	Àgua coletada no Rio Doce	Subcrônico	Alteração histológica, imunorreação em HSP70 alteração em NKA	Macêdo et a., 2020
Microcrustaceos, peixe e bactéria	Água coletada no Rio Doce	Agudo e crônico	Reprodução, crescimento e mortalidade	Mendes et al., 2020
Peixe de água doce (Astyanax lacustris)	In loco	Crônico	Maturação das gônadas e histopatologia	Merçon et al., 2021
Girinos (Lithobates catesbeianus)	Elutriado	Agudo e crônico	Desenvolvimento, taxas de respiração, desempenho na natação e comportamento de evitação	Girotto et al., 2020
Perifiton	In loco	2 períodos após o desastre	Comunidade perifitica	Zorzal- Almeida & Fernandes 2021
Alga, microcrustaceos, peixe, <i>Allium cepa</i>	Água e sedimento coletados no Rio Doce.	Agudo e crônico	Acumulação de metal, citogenotoxicidade e mutagenicidade	Vergílio et al., 2021

Comunidade planctonica	In loco	Retirada de amostras ao longo de 1 ano	Abundância, composição e diversidade	Bonecker et al., 2022a
Cominidade planctonica marinha	In loco	6 períodos após o desastre	LPO, indução de MT	Marques et al., 2022
Peixe marinho e recife de corais	In loco	Crônico	Composição de espécies, abundância e diversidade	Condini et al., 2022
Peixe estuarino	In loco	Crônico	Concentração de metais em otólitos	Daros et al., 2022
Peixe de água doce (Astyanax lacustris)	In loco	Retirada de amostras ao longo de 1 ano	Bioconcentração, atividade de CAT e GST,	Merçon et al., 2022
Elasmobranchia marinho	In loco	Crônico	Metalotioneina e subcelular concentração de metais	Hauser- Davis et al., 2022
Zooplancton marinho	In loco	4 períodos após o desastre	Riqueza, diversidade, concentração de metais,	Rocha et al., 2022
Microbioma da água e sedimento marinho	In loco	Três anos após o rompimento da barragem	Abundância	Fernandes et al., 2022
Tartaruga marinha (Caretta caretta)	In loco	Crônico	Parasitismo, alterações morfológicas, concentração de	Miguel et al., 2022
Comunidde	In loco	4 períodos após	metais Diversidade e	Bonecker et
ictioplantonica marinha Golfinho marinho	In loco	o desastre 2 períodos após o desastre	abundância Alteração bioacústica	al., 2022b Amorim et al., 2022
Embriões de peixe de água doce ( <i>Rhamdia</i> quelen)	Elutriado	96 h	Deformidades, danos em DNA	Yamamoto et al., 2022a
Microorganismos	In loco	Crônico	Abundãncia de grupos associados a presença de metais	De Almeida et al., 2023
Peixes de água doce	In loco	Crônico	Concentração de metais no músculo	Mourão et al., 2023
Peixes de água doce	In loco	Crônico	Aumento da expressão de Metalotioneina, danos em DNA, peroxidação lipídica, atividade de AChE, GST e GSH	Yamamoto et al., 2023b
Molusco Corbicula flumínea	Sedimento coletado no Rio Doce	Subcrônico (14 dias)	Bioacumulação de metais	Pauly et al., 2023

## Capítulo II

Tabela S1. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

pontos de co	ontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.						
	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5		
GUA	-6.7132	2.1227	3.8315	0.0664	0.6687		
GUA	-6.8191	2.7825	3.5793	0.80299	0.7517		
GUA	-6.7771	2.5917	2.8879	0.59405	0.4603		
GUA	-6.947	2.2497	4.3119	0.48311	0.2488		
GUA	-7.0917	2.8956	3.7331	0.28312	0.6830		
GUA	-7.3098	3.083	2.8613	1.331	0.2977		
GUA	-6.2446	2.2712	3.7127	-0.3166	1.0579		
GUA	-6.6126	2.7817	3.0717	0.8187	0.5824		
GUA	-7.0741	3.1882	3.1112	0.7684	0.6182		
GUA	-6.4202	2.5137	3.7165	1.0064	0.8189		
CAN	-2.3011	-0.2795	-2.2644	0.6049	-3.9587		
CAN	-2.1653	-0.1985	-1.6284	-0.0659	-4.1426		
CAN	-2.2016	0.0317	-2.0865	0.14736	-3.7217		
CAN	-2.0239	-0.3120	-1.7678	-0.1051	-3.5477		
CAN	-2.278	-0.2210	<b>-</b> 2.1395	0.4633	-3.9135		
CAN	-2.1316	-0.4073	-1.7566	0.05600	-3.8009		
CAN	-2.342	-0.2788	-2.3315	0.4016	-4.1484		
CAN	-2.2271	-0.5437	-1.5542	-0.2295	-4.3266		
CAN	-2.2428	0.3439	-2.2658	0.3575	-4.2538		
CAN	-3506	-0.0934	-2.0899	0.0517	-3.92		
NAQ	3.6701	3.7766	-2.472	3.4392	0.9936		
NAQ	3.9467	4.1191	-2.5732	3.9056	1.1756		
NAQ	3.9194	3.9348	2563	3.8733	1.1206		
NAQ	4.0722	3.4559	-2.0735	2.098	1.1616		
NAQ	4.047	3.2954	-1.8884	2.3796	1.3149		
NAQ	3.9649	3.59	-2.2125	2.6765	1.3293		
NAQ	3.9238	3.2741	-1.8584	2.673	1.2788		
NAQ	3.9714	2.8839	-1.9287	2.943	1.8402		
NAQ	4.1352	3.4907	-1.8761	3.0044	1.2208		
NAQ	3.707	3.2029	-1.5967	3.6543	1.6318		
REF	-1.191	-5.7326	-0.1953	1.685	0.31169		
REF	-0.8938	-6.1404	-0.0280	1.9531	0.7777		
REF	-0.8480	-6.3224	0.26422	1.4812	1.105		
REF	-0.8107	-6.4465	-0.21432	1.8849	0.9111		
REF	-0.6085	-6.928	-0.02899	1.9559	1.4199		
REF	-0.6270	-6.9178	0.40035	1.2733	1.6163		
REF	-0.8389	-6.5436	-0.0650	1.7497	1.088		
REF	-0.6056	-6.8366	0.08091	1.1531	1.5262		
REF	-0.3977	-7.1267	0.5156	1.1448	1.7798		
REF	-0.7696	-6.2866	-0.1633	1.5982	1.1412		
GOV	6.9473	0.3482	2.929	-1.175	-1.2734		
GOV	7.4705	-0.2873	3.6014	-1.7827	-0.5690		
GOV	7.3575	-0.4510	3.4981	-1.4948	-0.4374		

GOV	7.5056	-0.3536	4.001	-1.9447	-0.6333
GOV	7.4987	-0.1363	3.4782	-1.9183	-0.7023
GOV	7.264	0.1412	3.0264	-1.7219	-1.0202
GOV	7.5273	0.5626	3.386	-2.0469	-1.4115
GOV	7.3334	0.06615	2.8215	-1.6583	-0.9573
GOV	7.2285	0.0299	3.131	-1.6353	-0.9598
GOV	6.8481	-0.0609	2.1486	-0.6807	-1.0456
AIM	-1.5409	0.7571	-2.6514	-3.7751	1.5932
AIM	-2.0454	0.8166	-2.9408	-3.4258	0.9106
AIM	-1.5458	0.7784	-2.5941	-3.8616	1.5112
AIM	-1.0848	0.4269	-2.5005	-4.2024	2.0161
AIM	-1.532	0.7872	-2.8299	-3.3214	1.6138
AIM	-1.3891	0.5172	-2.7939	-3.8205	2.0245
AIM	-1.2172	0.0615	-2.5406	-3.9994	2.2855
AIM	-1.3105	0.2060	-2.6397	-3.9412	2.2896
AIM	-1.3579	0.5534	-2.6888	-3.7888	2.0538
AIM	-1.4505	0.97307	-2.6041	-3.8508	1.5128

Tabela S2. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos contaminantes (metais, metaloides, piretroides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e matéria orgânica nas amostras de sedimento e os biomarcadores bioquímicos e moleculares.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
AchE	-0.3398	0.6039	0.0063	-0.0833	-0.2532
ESTalfa	0.44	-0.2447	0.6340	-0.2935	0.2809
ESTbeta	0.3996	-0.5543	0.3691	-0.3545	0.3374
GST	-0.2391	-0.0033	0.6855	-0.0036	0.0461
LPO	0.6173	-0.1032	0.0826	-0.3040	0.0974
SOD	0.3174	0.1934	0.4595	-0.5408	-0.3880
CAT	-0.1027	-0.0455	-0.0758	0.5635	-0.1028
DanosDNA	0.1548	-0.6491	0.2136	-0.1752	0.2456
HbC	-0.5708	-0.3414	-0.0500	0.1568	-0.4885
HbE	0.1072	0.4419	-0.2513	0.5424	0.0388
MT	-0.4510	0.2114	0.3055	0.0400	0.0885
As	-0.5573	0.4937	0.4906	0.3181	-0.3006
Cd	-0.4830	0.2994	0.7608	0.3001	0.04550
Cr	0.9319	0.1397	0.1942	0.2423	-0.1179
Cu	0.3617	-0.1743	0.3460	0.3958	-0.7410
Mn	-0.6756	0.3715	0.5923	0.2049	0.0932
Ni	0.4927	0.2593	0.0704	0.3169	-0.7500
Pb	0.2089	-0.7824	0.4307	0.3206	0.1986
Sc	0.4504	-0.8552	0.0334	0.2364	-0.0406
Ti	0.3304	-0.9129	0.0269	0.2049	-0.0893
V	0.4942	-0.7327	0.0327	0.2549	-0.3869
Zn	0.5760	-0.6026	0.4383	0.3213	-0.0044
Fe	-0.5595	0.2954	0.6958	0.3107	0.1167
Hg	-0.7056	0.2719	0.6230	0.0199	0.1866
Al	0.5647	-0.7816	0.0517	0.2214	0.0939

PER	0.6740	-0.2141	-0.2708	0.1182	-0.6351
CYF	0.8003	-0.1196	0.2737	-0.2062	-0.4696
CYP	0.8016	0.4443	0.0104	0.3657	0.1458
DEL	0.6289	-0.7028	0.2636	-0.033	0.14492
BIF	0.7211	-0.0019	0.5654	-0.3199	-0.2022
MatOrg	0.3458	-0.8913	0.1816	0.0840	0.17
Naf	-0.6470	0.3107	0.6489	0.1685	0.1759
1MNaf	-0.672	0.3657	0.6148	0.1163	0.1389
2MNaf	-0.5230	-0.438	0.4347	0.4053	0.3474
Aci	0.8935	0.2341	0.3731	-0.0143	-0.0542
Ace	0.5267	0.4397	-0.4152	-0.3517	0.4741
FI	0.8373	-0.0311	0.0937	0.4710	0.2469
DBT	0.6361	0.5771	0.2739	0.3281	-0.2666
Fen	0.8592	0.2948	-0.0363	0.4090	0.0282
Ant	0.7914	0.4688	-0.0386	0.3454	0.1672
Fltr	0.6934	0.4759	-0.1652	0.4483	0.2342
Pir	0.7535	0.4679	-0.1108	0.3869	0.2109
BeP	0.8819	0.4192	0.008	-0.0717	0.1949
BaP	0.3888	0.4837	-0.3661	0.6106	0.2933
IcdP	0.8682	0.2628	0.2136	-0.3354	0.0889
DahA	0.8776	0.2148	0.3150	-0.2694	-0.0480
BghiP	0.8766	0.2364	0.2714	-0.3026	0.0102
BaA	0.8834	0.4095	0.0917	0.1562	0.1302
Cri	0.9335	0.2170	0.2397	-0.1360	-0.0131
Per	0.3025	-0.6116	-0.1951	0.5000	0.4799
BbF	0.8441	0.2498	0.1998	-0.4068	0.0806
BkF	0.8686	0.3584	0.0540	-0.2728	0.1800

Tabela S3. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
GUA	-4.1861	0.9009	2.0115	2.2123	-0.2027
GUA	-4.147	-0.3115	2.6552	2.4424	-0.5162
GUA	-4.1804	-0.4003	2.1288	1.3054	-0.3849
GUA	-4.4296	0.7294	2.6235	3.0305	1.1708
GUA	-4.4181	-0.0307	3.3483	2.0558	-1.9474
GUA	-4.6735	-1.5209	3.1181	1.6474	-1.3891
GUA	-3.6022	1.11	1.8685	1.8368	-0.8739
GUA	-3.9397	-0.5597	2.2942	1.7655	-0.1128
GUA	-4.351	-0.9754	3.3128	1.5925	-2.0585
GUA	-3.7658	-0.0569	1.9532	2.9227	0.7118
CAN	-2.9973	-1.3589	0.2146	-1.8322	1.9145
CAN	-2.8107	-0.5200	0.8821	-1.6938	2.1081
CAN	<b>-</b> 2.782	-1.1245	0.7587	-1.9793	1.0051
CAN	-2.6514	-0.4624	0.3600	-1.6696	1.1332
CAN	-2.9496	-1.2286	0.3923	-1.8127	1.7167
CAN	-2.8123	-0.5294	0.3346	-1.5913	1.7054
CAN	-3.0534	-1.2645	0.349	-2.1922	1.8327
CAN	-2.9744	-0.1169	0.5847	-1.7518	2.5311
CAN	-2.7862	-1.6164	1.2678	-2.2818	1.7027

CAN	-2.9915	-1.0091	0.7939	-2.144	0.9263
NAQ	4.239	<b>-</b> 4.6919	-0.2295	0.1306	-0.2852
NAQ	4.6375	<b>-</b> 5.2583	-0.2055	0.4361	-0.0082
NAQ	4.5655	-4.9254	-0.2338	0.8377	0.4744
NAQ	4.6419	-3.1444	-0.3403	-0.4353	-1.0266
NAQ	4.5831	-3.1249	-0.6131	0.1506	-0.7171
NAQ	4.5555	-3.7699	-0.4168	-0.0593	-1.0485
NAQ	4.4355	-3.3354	-0.6465	0.4408	-0.3935
NAQ	4.4154	-3.2758	-1.5795	0.8725	-0.7939
NAQ	4.7186	-3.6877	-0.5582	0.6723	2.2357
NAQ	4.1909	-3.9214	-0.8686	1.7311	-0.0708
REF	-3.1574	-0.0487	-1.843	0.4337	0.4482
REF	-2.9035	0.2213	-2.775	1.1464	0.8566
REF	-2.8657	0.9051	-2.923	1.2702	0.0925
REF	-2.8867	0.4148	-3.4243	0.9379	0.5497
REF	-2.7534	0.8508	-4.3127	1.4992	0.4545
REF	-2.7385	1.6057	-3.9356	1.4272	-0.3147
REF	-2.927	0.6558	-3.4709	1.0882	0.3058
REF	-2.706	1.4523	-3.9333	0.9557	-0.5943
REF	-2.5225	1.9768	-4.3253	1.6731	-0.1067
REF	-2.781	0.5441	-3.1623	0.8134	-0.1907
GOV	5.5727	2.0634	1.4964	0.3255	0.7675
GOV	6.0588	3.5026	0.5588	1.0453	0.6265
GOV	5.8915	3.3189	0.1897	1.226	0.5003
GOV	6.0891	3.9098	0.7350	1.3946	0.9315
GOV	6.1196	3.4185	0.8054	0.6858	0.5464
GOV	5.8955	2.7278	1.1914	0.0684	0.3167
GOV	6.2916	2.9839	2.019	0.1019	1.2454
GOV	5.952	2.649	0.8552	-0.0898	0.3266
GOV	5.8338	2.8155	1.0235	0.3437	0.5512
GOV	5.3428	1.513	0.2816	-0.1111	0.4431
AIM	-0.5974	1.0633	0.3028	-2.3212	-1.3028
AIM	-1.1965	0.4596	0.6889	-2.6879	-0.7852
AIM	-0.6008	1.1247	0.4534	-2.3825	-1.2887
AIM	-0.1404	1.8185	-0.3079	-2.2861	-1.5084
AIM	-0.5917	0.5736	0.1484	-2.1779	-1.1455
AIM	-0.4690	1.2184	-0.3584	-2.36	-1.9345
AIM	-0.3714	1.8589	-0.9939	-2.0256	-1.822
AIM	-0.4397	1.6493	-0.8470	-2.1064	-1.9607
AIM	-0.4208	1.2344	-0.2706	-2.1792	-1.8023
AIM	-0.4583	1.0002	0.6542	-2.449	

Tabela S4. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos contaminantes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e dos biomarcadores bioquímicos e moleculares.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
AChE	-0.16217	-0.27842	0.71802	-0.17587
ESTalfa	0.40574	0.70827	-0.0785	0.43665
ESTbeta	0.2691	0.75352	-0.40808	0.23689

GST	-0.1924	0.34561	0.28816	0.60604
LPO	0.57713	0.39976	-0.17421	-0.07149
SOD	0.34622	0.55679	0.56884	-0.10938
CAT	-0.139	-0.43606	-0.15537	0.27976
DanosDNA	-0.01266	0.56657	-0.53115	-0.24397
HbC	-0.70616	-0.03132	-0.03831	-0.06176
HbE	0.21902	-0.72292	0.078421	0.11475
MT	-0.34646	-0.05966	0.42044	0.25208
Naf	-0.4725	-0.01619	0.54416	0.63564
1MNaf	-0.48322	-0.02264	0.60173	0.56864
2MNaf	-0.58278	0.061216	-0.24397	0.70989
Aci	0.92224	0.1849	0.14638	0.19677
Ace	0.68132	-0.10613	-0.00914	-0.38167
FI	0.79948	-0.18835	-0.37518	0.37481
DBT	0.74896	-0.28413	0.38638	0.24066
Fen	0.8923	-0.34815	-0.11043	0.15959
Ant	0.90016	-0.39326	0.008568	0.1637
Fltr	0.81052	-0.54332	-0.06456	0.15461
Pir	0.86554	-0.46252	-0.03773	0.15023
BeP	0.98572	-0.04293	0.077214	-0.02495
BaP	0.52134	-0.79435	-0.1353	0.13054
IcdP	0.9263	0.31538	0.15285	-0.0496
DahA	0.90636	0.34397	0.17977	0.017157
BghiP	0.91816	0.33502	0.16978	-0.01461
BaA	0.97385	-0.15793	0.060655	0.14025
Cri	0.9575	0.21697	0.090848	0.045177
Per	0.13135	-0.15113	-0.88081	0.30544
BbF	0.89988	0.36267	0.165	-0.10026
BkF	0.9594	0.1479	0.11335	-0.10516

Tabela S5. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e scores dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
GUA	-4.818	3.3683	-0.8833	0.3754
GUA	-5.4211	2.9497	-0.0773	0.15606
GUA	-5.1803	2.208	-0.19112	-0.28615
GUA	-5.1928	4.0078	-0.18649	0.22363
GUA	-5.831	3.0452	-0.57497	0.11109
GUA	-6.1534	2.2962	0.46644	-1.4865
GUA	-4.4254	2.852	-1.1235	1.4597
GUA	-5.1591	2.276	0.16458	0.18667
GUA	-5.9979	2.2893	-0.01916	-0.39844
GUA	-4.7814	3.1119	0.20306	0.65122
CAN	-0.60759	-1.5721	2.4082	-1.6481
CAN	-0.56917	-1.1532	2.2199	-0.43379
CAN	-0.75472	-1.6853	2.0733	-0.75556
CAN	-0.325	-1.284	1.7167	-0.40554
CAN	-0.64255	-1.5068	2.3098	-1.4429
CAN	-0.36723	-1.1447	1.9387	-0.78324

			0.0444	
CAN	-0.65236	-1.6834	2.3411	-1.6764
CAN	-0.37608	-0.90296	2.023	-0.70494
CAN	-1.0214	-2.0173	2.7929	-0.73774
CAN	-0.82294	-1.5843	1.9768	-1.0994
NAQ	-0.68161	-2.1827	1.7791	-0.70577
NAQ	-0.62923	-2.4841	2.3676	-0.19037
NAQ	-0.53844	-2.0418	2.3438	-0.14482
NAQ	-0.03893	-2.0763	2.3438	0.82306
NAQ	0.049191	-1.6923	0.67604	0.60586
NAQ	-0.24341	-2.093	0.7147	0.30372
NAQ	-0.06785	-1.515	0.98954	0.17827
NAQ	0.28751	-1.2955	0.4738	-0.36185
NAQ	0.003093	-1.6885	1.5007	0.61542
NAQ	-0.18623	-1.6416	1.5541	0.05835
REF	2.8429	1.3401	-0.02099	-2.4246
REF	3.465	1.6883	-0.13073	-2.3699
REF	3.638	2.0221	-0.87426	-1.8997
REF	3.801	1.6143	-0.46513	-2.6553
REF	4.3655	2.0213	-0.87742	-2.788
REF	4.3095	2.3689	-1.6001	-2.0135
REF	3.83	1.8229	-0.76229	-2.639
REF	4.2905	1.9271	-1.6214	-2.0553
REF	4.7095	2.4724	-1.7548	-1.6232
REF	3.7176	1.5097	-0.77064	-2.1587
GOV	2.4686	0.91211	1.2396	1.9358
GOV	3.4728	1.6501	0.2844	3.1374
GOV	3.481	1.7621	0.22518	2.4507
GOV	3.5318	2.066	0.24635	3.4882
GOV	3.3929	1.3692	0.37478	3.3276
GOV	2.949	0.85038	0.7223	2.6312
GOV	2.9115	0.79296	1.2227	4.2976
GOV	3.1016	0.6579	0.68983	2.5459
GOV	2.9965	1.0782	0.66581	2.5402
GOV	2.7227	0.46222	1.0545	0.34382
AIM	-1.1114	-2.5734	-2.8765	0.42311
AIM	-1.6849	-2.6412	-2.3949	-0.92011
AIM	-1.1459	-2.5554	-2.8517	0.43169
AIM	-0.38019	-2.5282	-3.4064	1.2709
AIM	-1.1232	-2.7052	-2.4739	-0.08284
AIM	-0.76088	-2.6549	-3.3193	0.29112
AIM	-0.25155	-2.2433	-3.7455	0.37215
AIM	-0.44815	-2.3587	-3.7283	0.30548
AIM	-0.76142	<b>-</b> 2.5694	-3.241	0.47139
AIM	-1.1846	-2.7175	-2.6837	0.87905
1 711A1	1.1070	2.1 110	2.0001	0.07000

Tabela S6. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* das variáveis inorgânicas e dos biomarcadores bioquímicos e moleculares.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
As	-0.77078	0.44635	0.41716	0.022227
Cd	-0.61222	0.75173	0.15919	0.073411
Cr	0.54486	-0.03583	0.50009	0.52946
Cu	0.36164	0.31049	0.82428	0.081862
Mn	-0.78489	0.60586	0.026588	-0.01769
Ni	0.17429	-0.11692	0.8958	0.29009
Pb	0.65601	0.66821	-0.04826	-0.25203
Sc	0.91398	0.25115	0.078623	-0.28169
Ti	0.87091	0.27969	0.050627	-0.36125
V	0.86493	0.17926	0.36993	-0.20034
Zn	0.79086	0.52044	0.22569	0.03449
Fe	-0.65844	0.72079	0.091283	0.000138
Hg	-0.74271	0.63682	-0.17623	0.006786
Αl	0.93902	0.2254	0.022632	-0.17395
AchE	-0.67516	-0.16941	0.21847	0.17386
ESTalfa	0.43775	0.51726	-0.29092	0.56669
ESTbeta	0.6462	0.37876	-0.47163	0.2999
GST	-0.21193	0.69104	-0.04427	0.23864
LPO	0.51994	-0.08779	-0.12278	0.57838
SOD	0.046981	0.11893	0.12813	0.74615
CAT	-0.03031	0.079802	0.41881	-0.38264
DanosDNA	0.54865	0.36499	-0.41543	-0.11595
HbC	-0.15821	0.20683	0.19981	-0.60469
HbE	-0.21326	-0.28235	0.45968	-0.07456
MT	-0.51568	0.30872	-0.07118	-0.12063

Tabela S7. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
GUA	-1.58	-2.58
GUA	-2.45	-1.29
GUA	-2.51	-1.09
GUA	-1.95	<b>-</b> 2.55
GUA	-2.80	-1.94
GUA	-3.98	-0.88
GUA	-0.85	-1.71
GUA	-2.34	-0.52
GUA	-3.36	-0.87
GUA	-1.63	-0.91
CAN	-1.90	1.07
CAN	-1.27	0.81
CAN	-1.70	1.21
CAN	-1.02	0.72
CAN	183	1.01
CAN	-1.19	0.59
CAN	-1.96	0.98

CAN	-1.10	0.21	
CAN	-1.09	1.97	
CAN	-1.87	0.80	
NAQ	-1.86	2.75	
NAQ	-1.76	3.89	
NAQ	-1.56	3.49	
NAQ	-0.47	2.09	
NAQ	-0.41	1.82	
NAQ	-0.94	2.34	
NAQ	-0.67	1.70	
NAQ	-0.48	1.20	
NAQ	-0.54	2.61	
NAQ	-0.95	2.46	
REF	-0.46	-1.03	
REF	0.25	-1.12	
REF	0.72	-1.92	
REF	0.50	-1.44	
REF	1.12	-1.93	
REF	1.50	-2.70	
REF	0.60	-1.83	
REF	1.38	-2.41	
REF	2.08	-2.71	
REF	0.58	-1.40	
GOV	3.46	1.03	
GOV	6.16	0.20	
GOV	4.93	-0.11	
GOV	4.46	-0.11	
GOV	5.09	0.53	
GOV	4.27	0.95	
GOV	4.79	1.81	
GOV	4.34	1.07	
GOV	4.32	0.68	
GOV	3.04	0.85	
AIM	-0.63	-0.66	
AIM	-1.74	-0.90	
AIM	-0.63	-0.66	
AIM	0.49	-0.72	
AIM	-0.89	-0.21	
AIM	-0.31	-0.85	
AIM	0.36	-1.44	
AIM	0.10	-1.39	
AIM	-0.24	-0.76	
AIM	-0.61	-0.26	

Table S8. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos piretroides e dos biomarcadores bioquímicos e moleculares.

PC 1	PC 2
-0.21	0.16
0.34	-0.19
0.34	-0.27
0.05	-0.26
0.0	0.10
0.21	0.08
-0.11	0.12
0.21	-0.34
-0.17	-0.21
-0.14	0.38
-0.16	-0.16
0.19	0.36
0.34	0.23
0.15	0.46
0.35	-0,09
0.36	0.11
	-0.21 0.34 0.34 0.05 0.0 0.21 -0.11 0.21 -0.17 -0.14 -0.16 0.19 0.34 0.15 0.35

Tabela S9. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
GUA	3.4307	-4.0487	0.46454	-1.1864
GUA	4.1182	-3.5366	0.47475	-1.9903
GUA	3.9578	-3.1376	-0.08211	-1.3673
GUA	3.9	-4.4344	0.42688	-1.1994
GUA	4.2784	-4.187	0.36741	-1.9529
GUA	4.889	-3.3702	-0.91734	-2.1824
GUA	3.0156	-3.5409	1.4252	-1.2328
GUA	4.0078	-2.921	0.44723	-1.6413
GUA	4.5883	-3.4712	-0.00043	-2.1956
GUA	3.6982	-3.11	0.95125	-1.8016
CAN	3.3213	0.99597	-1.9871	2.9107
CAN	3.1868	0.46317	-0.97299	3.3479
CAN	3.3032	0.86912	-1.2139	2.7602
CAN	2.8427	0.66817	-0.9284	2.9121
CAN	3.3026	0.87934	-1.792	2.8809
CAN	2.9547	0.5805	-1.2629	3.0803
CAN	3.3469	0.90098	-2.0681	3.1742
CAN	2.9947	0.18963	-1.2973	3.7461
CAN	3.7371	1.1217	-1.1888	3.0429
CAN	3.3462	0.61823	-1.5717	2.9772
NAQ	2.205	4.456	-0.12007	-2.0003
NAQ	2.3273	5.1474	0.46978	-2.3984
NAQ	2.2288	4.8446	0.51103	-2.2969
NAQ	1.3432	4.0157	1.0121	-1.2308
NAQ	1.284	3.9423	0.87819	-1.4635
NAQ	1.6079	4.257	0.66624	-1.7663

NAQ	1.4352	3.8909	0.55365	-1.6194
NAQ	1.0495	4.0038	0.11929	-2.0736
NAQ	1.5411	4.3656	1.0265	-1.709
NAQ	1.7175	4.3224	0.56856	-1.9445
REF	-2.9629	-0.55691	-2.5919	-0.35575
REF	-3.5026	-0.30515	-2.4552	-0.62241
REF	-3.8459	-0.69376	-2.1256	-0.62007
REF	-3.8237	-0.18835	-2.7576	-0.49932
REF	-4.4119	-0.18228	-2.8141	-0.76058
REF	-4.5956	-0.78488	-2.2311	-0.68031
REF	-3.9517	-0.41486	-2.7465	-0.60773
REF	-4.5688	-0.57165	-2.3214	-0.52011
REF	-4.9706	-0.6906	-1.8978	-0.57838
REF	-3.8699	-0.25785	-2.3475	-0.65932
GOV	-1.6587	-0.31962	2.4408	1.235
GOV	-2.7722	-0.56874	3.4585	1.3166
GOV	-2.7749	-0.56379	2.8937	1.0813
GOV	-2.8538	-0.88791	3.7808	1.444
GOV	-2.6907	-0.4707	3.6016	1.4577
GOV	-2.2223	-0.30558	2.9978	1.4561
GOV	-2.0673	-0.21139	4.4041	1.9547
GOV	-2.326	-0.06422	2.8957	1.4914
GOV	-2.2655	-0.40026	2.9155	1.4086
GOV	-1.8387	0.18314	1.039	1.0271
AIM	-2.258	-0.71658	-0.05062	-0.28614
AIM	-1.6199	-0.9653	-1.2543	-0.03035
AIM	-2.2417	-0.80648	-0.02742	-0.21677
AIM	-3.0107	-0.53842	0.65895	-0.13396
AIM	-2.1462	-0.40285	-0.3761	-0.56266
AIM	-2.6559	-0.53338	-0.15932	-0.49246
AIM	-3.2004	-0.70163	-0.09523	-0.4139
AIM	-3.0225	-0.67548	-0.16682	-0.51548
AIM	-2.6505	-0.54247	0.021229	-0.55867
AIM	-2.1802	-0.63678	0.35115	-0.33864

Tabela S10. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* dos elementos inorgânicos bioconcentradas nas larvas e dos biomarcadores bioquímicos e moleculares.

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
AchE	0.20263	-0.05656	0.087021	0.016713
ESTalfa	-0.17822	-0.13066	0.3177	-0.02715
ESTbeta	-0.25829	-0.10655	0.1495	0.005019
GST	0.037595	-0.24111	0.14217	-0.06862
LPO	-0.1581	0.081762	0.29036	0.10392
SOD	-0.01047	-0.12346	0.38034	0.27757
CAT	0.078555	0.097556	-0.16447	-0.06897
DanosDNA	-0.2121	-0.10598	-0.06992	0.012442
HbC	0.090937	-0.12795	-0.35555	0.20588
HbE	0.13107	0.23054	0.013954	-0.1744

MT	0.10992	0.04475	-0.0356	-0.16992
Al	0.1981	0.29058	0.17336	-0.05485
Ва	0.20256	-0.24563	0.10542	-0.2506
Ca	0.039215	0.36203	0.069795	-0.14287
Cd	0.29075	0.077119	0.17585	0.033598
Cr	0.16421	0.22412	0.23064	0.24379
Cu	0.23771	0.20483	-0.11981	0.19741
Fe	0.29924	0.023678	0.1103	-0.11562
K	0.25388	-0.0173	-0.184	-0.14763
Li	0.22369	0.033699	0.30679	0.077872
Mg	-0.0186	0.12088	0.13278	0.49843
Mn	0.21382	-0.2437	0.06764	-0.22709
Na	0.29826	-0.07194	-0.03417	0.13953
Р	-0.25026	0.22465	0.018906	-0.1299
Pb	0.076122	0.34473	0.078336	-0.26501
S	-0.26136	0.19309	0.070023	-0.13336
Se	0.13815	-0.25595	0.03543	0.23768
Zn	0.023696	0.19051	-0.37346	0.30326

Tabela S11. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *scores* dos pontos de coleta de sedimentos na bacia do Rio Doce.

	PC 1	PC 2
GUA	-6.0727	0.99126
CAN	-2.0253	0.24566
NAQ	3.9412	-3.693
REF	0.77976	6.084
GOV	6.652	0.44795
AIM	-3 2749	-4 0759

Tabela S12. Variância dos dados explicada pelos componentes principais e *loadings* da granulometria e contaminantes químicos (metais, metaloides, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e piretroides) dos sedimentos da bacia do Rio Doce e a frequência de alterações histológicas analisadas.

	PC 1	PC 2	
LodoArgila	0.18065	0.12519	
AreiaMuitoFina	0.06497	0.16122	
AreiaFina	-0.10451	0.10244	
AreiaMedia	-0.09895	-0.2014	
AreiaGrossa	-0.07372	-0.20964	
AreiaMuitoGrossa	-0.1499	-0.05716	
MatOrg	0.097085	0.19994	
Naf	-0.12383	0.053292	
1Mnaf	-0.1327	0.035441	
2Mnaf	-0.08426	0.20792	

Aci	0.18388	-0.0488
Ace	0.074748	-0.22038
FI	0.19212	0.005265
DBT	0.13646	-0.08726
Fen	0.18561	-0.08011
Ant	0.16432	-0.12516
Fltr	0.14582	-0.13166
Pir	0.15686	-0.13029
BeP	0.1678	-0.14788
BaP	0.086123	-0.13204
IcdP	0.16173	-0.10505
DahA	0.16977	-0.07199
BghiP	0.16672	-0.08696
BaA	0.17922	-0.1146
Cri	0.18521	-0.07517
Per	0.090965	0.11649
BbF	0.154	-0.10821
BkF	0.15912	-0.14411
Al	0.14342	0.1627
As	-0.10364	0.018825
Cd	-0.08208	0.076924
Cr	0.20183	-0.02933
Cu	0.1036	0.12293
Fe	-0.09868	0.071789
Hg	-0.14146	0.049011
Mn	-0.13011	0.040432
Ni	0.1131	-0.01926
Pb	0.079869	0.23241
Sc	0.12264	0.18841
Ti	0.098185	0.20549
V	0.13133	0.1737
Zn	0.15235	0.18314
PER	0.14719	0.011742
CYF	0.16568	0.020322
CYP	0.16871	-0.11177
DEL	0.14761	0.14619
BIF	0.14536	0.016016
GCG	0.017039	0.21753
GRII	0.063392	0.22227
SRI	0.09284	-0.0602
SRII	0.080103	0.015402
ARIII	0.022016	-0.09014
VCT	0.10758	0.13542
VCE	0.13166	0.18049
Trofocitomegalia	0.12419	0.13686
ANT	0.090239	0.21373
GTM	0.086123	0.086123
O I IVI	0.000120	0.000123