

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - EESC

LAIS GIROTTO

Avaliação da toxicidade aguda e crônica em girinos da espécie *Lithobates catesbeianus* expostos ao rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem do Fundão (Mariana-MG).

São Carlos

2018

LAIS GIROTTO

Avaliação da toxicidade aguda e crônica em girinos da espécie *Lithobates catesbeianus* expostos ao rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem do Fundão (Mariana-MG).

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Dra. Juliane Silberschmidt Freitas

São Carlos
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

G526a Giroto, Lais
 Avaliação da toxicidade aguda e crônica em girinos
 da espécie *Lithobates catesbeianus* expostos ao rejeito
 de mineração proveniente do rompimento da Barragem do
 Fundão (Mariana-MG). / Lais Giroto; orientador Juliane
 Silberschmidt Freitas. São Carlos, 2018.

 Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
 Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
 São Paulo, 2018.

 1. Desastres ambientais. 2. Anfíbios. 3. Metais. 4.
 Conservação. 5. Ecotoxicologia. 6. Comportamento. I.
 Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Lais Girotto**

Data da Defesa: 27/11/2018

Comissão Julgadora:

Resultado:

Juliane Silberschmidt Freitas (Orientador(a))

Aprovada

Raquel Aparecida Moreira

Aprovada

Ana Maria Vasconcelos

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat
Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

*Dedico este trabalho à minha
família, em especial ao meu Vô
Dito, por acreditar em mim até seu
último dia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter guiado meus passos e permitido que tudo desse certo, mesmo quando eu duvidava.

Aos meus pais, Claudinei e Lilian, por todo amor, dedicação e incentivo ao longo da minha vida e por serem meus maiores exemplos de dedicação e força.

Aos meus avós, Benedicto (Vô Dito), Cecília e Maria Aparecida (Vó Nê), que sempre estiveram presentes na minha vida e cuidaram de mim assim como meus pais.

À minha orientadora Dr. Juliane Silberschmidt Freitas a grande responsável pela realização desse trabalho, pela orientação, dedicação, paciência e apoio sempre que precisei, pelos fins de semana passados no laboratório, cuidando dos girinos ou renovando as soluções e pelos momentos de descontração que serão guardados com carinho.

A todos da família NEEA Anatomy, em especial o Prof. Dr. Evaldo Gaeta Espíndola, por me acolherem e me aconselharem tão bem e por fazerem meus dias no laboratório tão divertidos.

À turma de 2012 da Engenharia Ambiental, assim como às de 2013 e 2014, as quais me receberam após o intercâmbio, pelo companheirismo e amizade.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial aos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

E a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse trabalho.

*“A lama passou.
A comoção passou.
A imprensa passou.
O tempo passou.
O Bento
não tem mais
A comunidade reunida
não tem mais.
A alegria de viver juntinho
não tem mais.
O que te – e não tinha –
são as pessoas
se adoecendo por causa
de um trauma tão grande.
Isso passa na cabeça
de quem diz que
“o pior já passou”?”
(Dona Marcelina)*

RESUMO

GIROTTI, L. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica em girinos da espécie *Lithobates catesbeianus* expostos ao rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem de Fundão (Mariana-MG)**. 2018. 108 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O setor de mineração, embora economicamente importante, é responsável por diversos impactos ao longo de seu processo, além daqueles relacionados aos riscos de desastres. O rompimento da barragem do Fundão em Mariana-MG resultou no derramamento de 62 milhões de m³ de rejeito de mineração nos corpos hídricos da bacia do Rio Doce, afetando toda a biota. Embora haja um aumento nas investigações, até o momento não foram fornecidas informações suficientes para avaliação dos reais riscos causados, principalmente para grupos mais vulneráveis, tais como os anfíbios. Atualmente, os anfíbios são um dos principais grupos ameaçados de extinção e a contaminação de habitat é apontada como um dos principais fatores contribuindo para o declínio de diversas espécies. Visando a maior compreensão da magnitude dos danos causados sobre a biota, o presente trabalho buscou simular as condições do desastre em escala laboratorial, avaliando os efeitos agudos e crônicos. Para isso, girinos de *Lithobates catesbeianus* foram expostos a diferentes diluições do rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem de Fundão – 10%, 25%, 50%, 75% e 100% - a partir de uma solução estoque contendo 50g de rejeito, coletado posteriormente ao desastre ocorrido no município de Mariana, MG. Os períodos experimentais foram de 96 horas para avaliação de efeitos agudos e de 16 e 20 dias para avaliação dos efeitos crônicos. Os *endpoints* analisados foram mortalidade, desempenho natatório, crescimento, desenvolvimento e taxa de consumo de oxigênio. A capacidade de fuga e migração dos girinos também foi avaliada pelo teste de evitamento. Além disso, foram realizadas análises químicas para verificação dos metais presentes nas amostras dos diferentes tratamentos. Foi constatado que o rejeito não causou mortalidade nos girinos, entretanto, efeitos subletais na capacidade natatória foram observados mesmo após a exposição aguda. Os efeitos subletais foram intensificados após a exposição crônica, de forma que todos os tratamentos mostraram uma diminuição na capacidade natatória após 16 dias. A taxa de consumo de oxigênio em girinos expostos a 100% da solução de rejeito também foi inferior aos demais tratamentos. O teste de evitamento mostrou que os girinos não apresentam comportamento de evitar os ambientes onde há maior presença do rejeito, podendo assim permanecer expostos às diferentes concentrações de metais por período prolongado. As análises químicas mostraram a presença de Cd, Pb, Fe, Mn, Zn e Al, de forma que a concentração desses metais aumentou proporcionalmente com a quantidade adicionada de solução estoque. Este estudo mostra dados inéditos sobre a toxicidade gerada pelo rejeito de mineração proveniente do desastre da barragem de Fundão em anfíbios, ressaltando que mesmo apresentando baixa toxicidade em termos de mortalidade, os efeitos subletais de exposição em longo prazo podem tornar as fases larvais desses animais susceptíveis a danos fisiológicos e comportamentais. As consequências desses efeitos podem se estender em escala populacional e gerar um desequilíbrio ecossistêmico local.

Palavras-chave: Desastres ambientais; Anfíbios; Metais; Conservação; Ecotoxicologia; Comportamento;

ABSTRACT

GIROTTI, L. **Evaluation of acute and chronic toxicity of the mining tailings from the rupture of Fundão Dam in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Mariana-MG).** 2018. 108 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Despite the economic importance, the mining sector is responsible for several environmental impacts throughout its process, in addition to those related to disaster risks. The rupture of the Fundão dam in Mariana-MG resulted in the spillage of 62 million m³ of mining tailings in the water bodies of the Rio Doce basin, affecting the entire biota. Although there is an increase in investigations, the information provided to assess the real risks still insufficient, especially for more vulnerable groups such as amphibians. Currently, amphibians are one of the main groups threatened with extinction and habitat contamination is pointed out as one of the main factors contributing to the decline of several species. Aiming at the greater understanding of the magnitude of the biota damages, this present work sought to simulate the conditions of the disaster in a laboratory scale, evaluating the acute and chronic effects. For this, tadpoles of *Lithobates catesbeianus* were exposed to different volumetric proportions of the mining tailings from the Fundão dam rupture -10%, 25%, 50%, 75% and 100% from a stock solution containing 50g the tailing, which was collected after the disaster occurred in Mariana, MG. The experimental periods were 96 hours for evaluation of acute effects and 16 and 20 days for evaluation of chronic effects. The endpoints analyzed were mortality, swimming performance, growth, development and rate of oxygen consumption. The ability to detect contaminated environments and migration of tadpoles was also evaluated by the avoidance test. In addition, chemical analyzes were performed to verify the presence of metals in the samples of the different treatments. It was found that the reject did not cause mortality in tadpoles, however, sublethal effects on swimming capacity were observed even after acute exposure of 16 days. The sublethal effects were intensified after chronic exposure, so that all treatments showed a decrease in swimming capacity. The rate of oxygen consumption in tadpoles exposed to 100% of the tailings solution was also lower than the other groups. The avoidance test showed that tadpoles did not present behavior to avoid environments where there were more tailings, making the animals exposed to the different concentrations of metals for a prolonged period. The chemical analyzes showed the presence of Cd, Pb, Fe, Mn, Zn and Al, so that the concentration of these materials increased according to the percentage of stock solution. This study shows unpublished data on the toxicity generated by the mining tailings from the dam of Fundão in amphibians, pointing out that even though they have low mortality toxicity, the sublethal effects of long-term exposure can make the larval stages susceptible to physiological and behavioral damages. The consequences of these effects can extend into population scale and generate a local and regional ecosystem imbalance.

Keywords: Environmental disasters; Amphibians; Metals; Conservation; Ecotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização do município de Mariana no Brasil e no Estado de Minas Gerais.....	37
Figura 2 - Localização das três barragens de contenção de rejeitos presentes no município de Mariana, de propriedade da mineradora SAMARCO.....	38
Figura 3 - (a) Tanques nos quais os girinos eram aclimatados; (b) Girinos de <i>L. catesbeianus</i> no tanque de aclimação.....	40
Figura 4 - (a) Montagem do teste de exposição aguda com girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 25 de Gosner (1960); (b) réplica do controle do teste de exposição aguda; (c) réplica do tratamento composto pela diluição de 50% da solução estoque do teste de exposição aguda.....	41
Figura 5 - Aparelhos utilizados para a medição dos parâmetros físico-químicos das amostras. (a) pH-metro Micronal B74; (b) oxímetro YSI 55; (c) condutivímetro Orion 145A+.....	42
Figura 6 - (a) Montagem do teste de exposição crônica 1 com girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 25 de Gosner (1960); (b) réplicas do controle do teste de exposição crônica 1; (c) réplicas do tratamento composto pela diluição de 25% da solução estoque do teste de exposição crônica 1.....	43
Figura 7 - Coleta do fígado e músculo da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 20 dias a concentrações subletais do rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem do Fundão.....	44
Figura 8 - Estrutura utilizada para gravação dos vídeos utilizados na análise de mobilidade natatória de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos ao rejeito de mineração.....	45
Figura 9 - Montagem e equipamentos utilizados para análise da taxa de consumo de oxigênio (respirometria) de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos a concentrações subletais de rejeito de mineração.....	46
Figura 10 - (a) Representação esquemática do sistema de evitamento (avoidance); (b) Adaptação do sistema de “avoidance” utilizado para análise comportamental dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> à exposição ao rejeito de mineração.....	48
Figura 11 - Parâmetros físicos e químicos dos tratamentos e controle no qual foram expostos girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao rejeito de mineração, aferidos ao início e ao final do período experimental agudo (96 horas)	52

Figura 12 - Capacidade natatória (distância percorrida e velocidade máxima de natação) de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 96 horas ao rejeito de mineração.....	53
Figura 13 – Média de girinos de <i>L. catesbeianus</i> presente em cada compartimento contendo diferentes diluições do rejeito de mineração ao final do período experimental de 12 horas.....	54
Figura 14 - Média da condutividade, sólidos dissolvidos totais e turbidez das quatro réplicas do sistema de avoidance no qual foram expostos girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao rejeito de mineração, aferidas ao início e final do período experimental de 12 horas.....	55
Figura 15 - Média dos parâmetros físico e químicos dos tratamentos e controle no qual foram expostos girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao rejeito de mineração, aferidos a cada renovação de solução (96 horas), da exposição crônica 1, de duração de 16 dias.....	56
Figura 16 - Capacidade natatória (distância percorrida e velocidade máxima de natação) de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.....	58
Figura 17 - Comprimento e peso finais de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.....	59
Figura 18 - Estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.....	60
Figura 19 - Média dos parâmetros físico e químicos dos tratamentos e controle no qual foram expostos girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao rejeito de mineração, aferidos a cada renovação de solução (96 horas), da exposição crônica 2, com duração de 20 dias.....	61
Figura 20 - Capacidade natatória (distância percorrida e velocidade máxima de natação) de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 20 dias ao rejeito de mineração.....	62
Figura 21 - Comprimento e peso finais de girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.....	63
Figura 22 - Estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 20 dias ao rejeito de mineração.....	64
Figura 23 - Taxa de consumo de oxigênio por grama de animal dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> expostos por 20 dias ao rejeito de mineração.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição mineralógica dos rejeitos armazenados na Barragem do Fundão, segundo informado pela SAMARCO.....	39
Tabela 2 – Concentrações médias (mg/L) de metais detectados a montante (P1) e a jusante (P2 e P3) da barragem do Fundão após o desastre, segundo estudo de Carvalho et al. (2017).....	39
Tabela 3 – Valores de p para teste de multi-comparação Kruskal-Wallis, em relação à velocidade máxima de natação por girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 96 horas.....	53
Tabela 4 – Número de girinos presente em cada compartimento ao final das 12 horas do teste de evitamento.....	54
Tabela 5 – Número de mortes e sobreviventes dos girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 16 dias.....	57
Tabela 6 – Valores de p para teste de multi-comparação Kruskal-Wallis da distância percorrida por girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 16 dias.....	58
Tabela 7 – Valores de p para teste de Tukey para comparar a velocidade máxima de natação dos girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 16 dias.....	58
Tabela 8 – Valores de p para teste de Tukey para comparar a taxa de consumo de oxigênio de girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 20 dias.....	65
Tabela 9 – Concentração de metais encontrada nos tratamentos utilizados para a exposição de girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao rejeito de mineração.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Contaminação por resíduos de mineração e o desastre de Mariana-MG.....	27
2.2 Efeito antrópico sobre os anfíbios.....	29
2.3 Estudos ecotoxicológicos em áreas contaminadas.....	31
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo geral.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5 METODOLOGIA.....	37
5.1 Área de estudo.....	37
5.2 Coleta do rejeito contaminante para estudo ecotoxicológico.....	38
5.3 Organismo-teste.....	39
5.4 Exposição aguda.....	40
5.5 Exposição crônica.....	42
5.5.1 Análises morfológicas.....	44
5.6 Análise de mobilidade.....	44
5.7 Respirometria.....	45
5.8 Teste de evitamento.....	47
5.9 Análise estatística.....	49
5.10 Quantificação dos metais.....	49
6 RESULTADOS.....	51
6.1 Exposição aguda.....	51
6.1.1 Letalidade.....	52
6.1.2 Análise de mobilidade.....	53
6.2 Teste de evitamento.....	54
6.3 Exposição crônica 1 (16 dias).....	55
6.3.1 Letalidade.....	57
6.3.2 Análise de mobilidade.....	57
6.3.3 Análises morfológicas.....	58
6.4 Exposição crônica 2 (20 dias)	60

6.4.1 Letalidade.....	62
6.4.2 Análise de mobilidade.....	62
6.4.3 Análises morfológicas.....	62
6.4.4 Respirometria.....	64
6.5 Biomarcadores.....	65
6.6 Quantificação dos contaminantes.....	65
7 DISCUSSÃO.....	67
8 CONCLUSÕES FINAIS.....	73
9 SUSGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE A – Dados obtidos na exposição aguda.....	87
APÊNDICE B – Tabela de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para a distância percorrida pelos girinos expostos no teste agudo.....	89
APÊNDICE C – Parâmetros físicos e químicos da exposição aguda	89
APÊNDICE D – Calibração com NaCl do sistema de evitamento (avoidance).....	89
APÊNDICE E – Calibração sem contaminação do sistema de evitamento (avoidance).....	91
APÊNDICE F – Parâmetros dos sistemas de evitamento (avoidance).....	91
APÊNDICE G – Dados obtidos na exposição crônica 1 (16 dias).....	93
APÊNDICE H – Peso inicial de girinos ao início da exposição crônica 1 (16 dias).....	95
APÊNDICE I – Tabela de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para o peso dos girinos da exposição crônica 1 (16 dias).....	95
APÊNDICE J – Tabela de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para o comprimento dos girinos da exposição crônica 1 (16 dias).....	95
APÊNDICE K – Parâmetros físicos e químicos da exposição crônica 1 (16 dias).....	97
APÊNDICE L – Dados obtidos na exposição crônica 2 (20 dias).....	99
APÊNDICE M – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para distância percorrida pelos girinos da exposição crônica 2 (20 dias).....	101
APÊNDICE N – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Tukey para velocidade máxima de natação dos girinos da exposição crônica 2 (20 dias).....	101
APÊNDICE O – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para comprimento dos girinos da exposição crônica 2 (20 dias).....	101
APÊNDICE P – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para peso dos girinos da exposição crônica 2 (20 dias).....	101
APÊNDICE Q – Dados da respirometria obtidos após a exposição crônica 2 (20 dias).....	103

APÊNDICE R – Parâmetros físicos e químicos da exposição crônica 2 (20 dias).....	105
ANEXO A – Estágios de desenvolvimento de girinos.....	107

1 INTRODUÇÃO

A atividade mineradora iniciou-se no Brasil colonial, dada a necessidade econômica de exploração de outros produtos além do pau-brasil, açúcar e tabaco. Com a descoberta de jazidas de ouro durante o século XVIII, o país tornou-se o maior produtor mundial do minério. Desde então, este setor tem passado por diversos ciclos de ascensão e queda (MINERAL (CETEM); BARRETO, 2001).

As maiores jazidas foram descobertas durante o século XX e, a partir desse período, o setor de mineração passou a representar uma parcela significativa da economia nacional, chegando em 2014 a ser responsável pela geração de 4% de todo o PIB do país (BRASIL, 2014). O Brasil é um dos maiores exploradores de minérios do mundo, sendo o segundo maior se tratando de minério de ferro, com cerca de 235 milhões de toneladas extraídas anualmente. Este valor representa cerca de 18% do total de ferro extraído mundialmente (FREITAS; SILVA; MENEZES, 2016). Atualmente, as empresas Companhia Vale do Rio Doce, Companhia Siderúrgica Nacional, a Feterco Mineração, Mineração de Trindade, Itaminas Comércio de Minérios e Samarco Mineração representam as maiores exploradoras de minério de ferro do país e apresentaram, em um intervalo de 10 anos, um crescimento de 550%, o que favoreceu um crescente aumento de investimentos recebidos (FREITAS; SILVA; MENEZES, 2016).

Apesar dos benefícios econômicos gerados para o país, a atividade de mineração apresenta diversos impactos que podem ser alocados nas seguintes categorias: poluição do ar, poluição sonora, poluição da água, incêndios causados pelo carvão, subsidência do terreno e rejeitos radioativos (CPRM, 2002). Entretanto, é necessário ressaltar que, além dos impactos citados anteriormente, existe a possibilidade de desastres ambientais resultantes de falhas não previstas (MINERAL CETEM; BARRETO, 2001). Neste contexto, destaca-se o acidente ocorrido no município de Mariana-MG, em novembro de 2015, onde se deu o rompimento da barragem de Fundão, resultando na contaminação por rejeitos de mineração de diversos corpos hídricos ao longo da bacia do Rio Doce, os quais atingiram posteriormente os ambientes marinhos.

Esse acontecimento levantou questões importantes relacionadas aos danos sociais e ambientais, tais como a perda de vidas, contaminação de água e solo, destruição de habitats, entre outros. Devido à imensa proporção do desastre, não se sabe ao certo as reais consequências dos impactos gerados aos diversos ecossistemas e, conseqüentemente, às

interações biológicas envolvendo organismos de diversos níveis tróficos da bacia do Rio Doce. Para compreender melhor a magnitude dos impactos de tal evento, instituições e centros de pesquisa, tais como o Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA-USP) e a Universidade Estadual Paulista (UNESP) em conjunto com o Grupo Independente de Avaliação de Impacto Ambiental (GIAIA), vêm direcionando esforços para avaliar os efeitos associados aos aspectos físicos, químicos e biológicos da liberação de rejeitos de mineração para o município de Mariana, MG e demais áreas envolvidas.

O presente estudo teve como intuito analisar os efeitos do aporte do rejeito de mineração sobre os anfíbios da espécie *Lithobates catesbeianus*, que durante sua fase aquática, podem ter sido afetados de diversas formas, direta ou indiretamente, pelas alterações ambientais drásticas resultantes do desastre ocorrido no município de Mariana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação por resíduos de mineração e o desastre de Mariana-MG

O processo de extração mineral é extremamente impactante ao meio ambiente em suas diversas etapas (SILVA; VIDAL; PEREIRA, 2001). Na fase de lavra, isto é, retirada do minério do solo, o maior impacto provém da falta de planejamento, o qual pode levar ao surgimento de processos erosivos. Durante o beneficiamento, ou processamento do minério, obtém-se o “concentrado”, que é a fração de minério de interesse econômico, e o “rejeito”, constituído de minerais sem importância comercial e outras substâncias, utilizadas durante o processo, que são descartadas (TEIXEIRA et al., 2000; GUILHERME et al., 2005).

A composição do rejeito varia de acordo com o processo pelo qual passa o minério. No processo de beneficiamento do caulim, por exemplo, há uma elevada concentração de cádmio (SILVA; VIDAL; PEREIRA, 2001), enquanto o método de extração físico-química do ouro apresenta mercúrio em seu rejeito (GALVÃO; COREY, 1987). Já a extração química do níquel apresenta contaminações por cromo (GARNIER et al., 2006). Além disso, lavras onde são produzidos rejeitos ricos em sulfetos de ferro, que na presença de oxigênio e umidade oxidam-se desencadeando o processo de acidificação, são marcadas pela presença da chamada “drenagem ácida de mina” (DAM). As DAM intensificam a contaminação por metais, disponibilizando suas formas de maior mobilidade no ambiente (FUNGARO, 2005).

No contexto de contaminação por rejeitos provenientes da atividade de mineração, destaca-se o desastre ambiental ocorrido no município de Mariana, estado de Minas Gerais. Na ocasião, houve o rompimento da Barragem do Fundão, uma das três barragens de contenção de rejeito pertencentes à Mineradora Samarco, resultando na liberação de cerca de 62 milhões de metros cúbicos de rejeito (OLIVEIRA, 2016). A tsunami de lama, composta por água, rejeitos sólidos e metais, extravasou a barragem de Santarém e atingiu também a barragem do Germano, mesmo que nenhuma apresentasse sinais de instabilidade após o acidente. O rejeito extravasado venceu as barragens em seu caminho e atingiu primeiramente os distritos de Bento Rodrigues e Paracatu de Baixo, estendendo-se ao longo de quase 700 km, afetando outras 41 cidades até alcançar a foz do Rio Doce, no Espírito Santo (OLIVEIRA, 2016). Adicionalmente, nos locais de maior velocidade da lama, houve a destruição de 1469 hectares de mata, sendo 770.23 hectares pertencentes a áreas de preservação permanente. Entre as áreas de preservação afetadas estão uma área de proteção

ocupada por índios Krenak, três Unidades de Conservação de Proteção Integral e seis Unidades de Conservação de Uso Sustentável (IBAMA, 2015).

As consequências do desastre englobam os aspectos sociais, econômicos e ambientais. No âmbito social, houveram perdas imensas, tais como a morte de dezenove pessoas e centenas de famílias desabrigadas (IBAMA, 2015; SANTOS, 2017). No âmbito econômico, foram registradas diversas perdas de infraestrutura e bens materiais das cidades, além da paralisação das atividades da Mineradora Samarco que sustentava a economia local (RODRIGUES, 2017; VALE, 2017). Por fim, no âmbito ambiental foram afetados diversos segmentos do meio biótico e abiótico, os quais ainda não são suficientemente contabilizados devido a escassez de estudos. A liberação de grande volume de lama pode causar compactação e impermeabilização do solo quando seca, alteração dos parâmetros físico-químicos que resultariam na infertilidade da região, além da eutrofização, assoreamento e mudança no curso dos corpos hídricos afetados (SANTOS, 2017; IBAMA, 2015). Além destes efeitos, direta e indiretamente relacionados aos parâmetros físico-químicos provocados pela lama, estão àqueles relacionados ao alastramento dos resíduos de contaminação química do solo e água.

Os metais são os poluentes mais abundantes nos ecossistemas aquáticos, e foi confirmado que o rejeito apresenta uma alta concentração destes elementos, sobretudo de arsênio e manganês, juntamente com ferro, alumínio, cromo, chumbo e outros (BARBA, 2015). Os metais são elementos que ocorrem de maneira natural no ambiente, sendo alguns necessários para funções fisiológicas em diversos organismos (KARAN et al., 1998; MCGEER et al., 2000). Entretanto, a contaminação por tais compostos causa preocupação por não serem biodegradáveis, apresentarem alta toxicidade, possuírem potencial de induzir danos ao material genético, além de terem a capacidade de bioacumulação, sendo diretamente absorvidos através da água, ou indiretamente através da cadeia alimentar (BAIRD, 2002). Embora se tenha consciência de que impactos irreversíveis foram causados pelo desastre sobre os mais variados ecossistemas, o ambiente aquático merece especial atenção, por ser receptor final das atividades do seu entorno, sendo considerado o ecossistema mais ameaçado da atualidade, sobretudo em relação à perda de biodiversidade (SALA et al., 2000; DUDGEON, 2005). Além das consequências diretas causadas pela contaminação propriamente dita, a liberação dos rejeitos acelera o processo de eutrofização pelo aumento na concentração de nutrientes e produção primária (HUTCHINSON, 1957). Esses processos alteram o equilíbrio da biota, aceleram processo de assoreamento, diminuem os níveis de oxigênio, o que resulta no estabelecimento de condições impróprias para o desenvolvimento

de determinados organismos e conseqüentemente, a redução na diversidade de espécies (TALAMONI; OKANO, 1997).

O rompimento da barragem do Fundão no município de Mariana (MG) merece especial atenção, uma vez que se trata de um evento em escalas sem precedentes no Brasil e as informações disponíveis até o momento são insuficientes para prever os reais riscos ambientais estabelecidos em longo prazo para as áreas próximas à região atingida. Deve-se considerar ainda que, sendo um acontecimento recente, pesquisas científicas e coletas de dados encontram-se em progresso, fato que retarda a disponibilidade de resultados, os quais são requeridos em nível de urgência. A toxicidade do rejeito e o tempo de recuperação do Rio Doce são questões que demandam mais estudos para a obtenção de resultados conclusivos. Por esse motivo, pesquisas envolvendo análises de risco para espécies vulneráveis são indispensáveis em programas de recuperação e conservação da área.

2.2 Efeito antrópico sobre os anfíbios

Nas últimas décadas, a população de anfíbios vem apresentando declínios em níveis preocupantes em escala mundial (ALFORD; RICHARDS, 1999). Segundo a “International Union for Conservation of Nature” (disponível em AmphibiaWeb, 2017) cerca de 43% de todas as espécies de anfíbios já identificadas no mundo estão em processo de declínio populacional, enquanto outras 32% estão ameaçadas de extinção. Este declínio populacional vem ocorrendo de maneira mais acentuada em espécies de anfíbios encontradas na América-do-Sul, sendo tais quedas registradas desde a década de 1980 (HEYER et al., 1988; CAREY, 1993). Dentre as principais causas deste fenômeno estão a destruição de habitats, presença de predadores, contaminação e a utilização como alimento ou animais de estimação (GARDNER, 2001), além das doenças e das mudanças climáticas (HERMAN; SOCOTT, 1992).

Devido ao ciclo de vida bifásico, os anfíbios podem ocorrer nos ecossistemas aquático e terrestre, em determinados períodos de seu desenvolvimento, fato que os tornam organismos bastante sensíveis e vulneráveis às alterações ambientais. Além disso, os anfíbios são organismos altamente susceptíveis a absorção de substâncias químicas, incluindo metais, devido à permeabilidade da pele tanto em adultos quanto em girinos (DEGARADY; HALBROOK, 2006). Durante seus estágios de vida larvais, os anfíbios normalmente ocupam pequenos corpos d’água com baixo volume de água, onde outros organismos aquáticos, tais como peixes, não ocorrem. Nesses ambientes, muitas vezes formados pelos encharcados de

áreas após períodos de chuvas prolongadas, o baixo volume de água carrega consigo concentrações de contaminantes presentes no solo, disponibilizando-os à fração de água na qual os girinos estão restritos até completarem a metamorfose. As concentrações de poluentes nesses ambientes normalmente são muito mais altas que àquelas encontradas em ambientes com maior volume de água, devido à baixa diluição.

Até o momento, pouquíssimos relatos foram feitos sobre os efeitos causados pelo rompimento da barragem do Fundão, em Mariana – MG para espécies de anfíbios. Entretanto, o desastre mostra-se como uma importante ameaça ao grupo, uma vez que apresenta, em grande proporção, dois dos principais fatores que contribuem para o declínio de espécies de anfíbios no mundo. O primeiro, notavelmente marcado pela destruição de habitats, devido a extensão da mancha de lama ao longo de quase 700 km em corpos hídricos da bacia do Rio Doce, adicionada à destruição de cerca de 1469 hectares de mata ciliar (IBAMA, 2015). O segundo é gerado pela contaminação ambiental, devido à propagação de rejeitos de mineração e ao considerável aumento na concentração de metais, tais como Cádmio (Cd), Níquel (Ni), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Mercúrio (Hg), Vanádio (V), Zinco (Zn), Arsênio (As), Chumbo (Pb), Cobre (Cu) e Lítio (Li), em áreas previamente não contaminadas (IBAMA, 2015).

Desta forma, não somente a destruição de habitats, mas a alteração da qualidade ambiental, a qual envolve diversos aspectos, dentre eles a alteração do uso do solo e a contaminação de sistemas naturais, devem ser considerados como referência para desvendar os riscos sob os quais espécies nativas estão enfrentando frente ao desastre. A falta de estudos destinadas à área, mantém uma lacuna sobre as principais consequências do evento no Brasil, dificultando a ação de medidas protetivas para grupos e espécies mais ameaçados. Na Índia, uma redução de 50% da riqueza de anfíbios foi registrada em áreas com atividade de mineração (KRISHNAMURTHY; HUSSAIN, 2004), mesmo que um desastre ambiental na mesma magnitude que àquela ocorrido no Brasil não tenha se estabelecido.

Embora, na maioria das vezes, as consequências de desastres ambientais que envolvam contaminação sejam mensurados pelos efeitos letais imediatos, interferências crônicas que afetem a fisiologia e a bioquímica dos indivíduos podem ser estabelecidos sem que haja mortalidade dos organismos, devido à característica de bioacumulação dos metais (LAM; GRAY, 2003). Por exemplo, metais como o cobre podem causar alterações no crescimento e desenvolvimento dos girinos, induzir malformações e alterar o comportamento de natação, os quais resultam no aumento do risco de predação e na diminuição da probabilidade de sobrevivência (GARCÍA MUÑOZ et al., 2009). Devido à importância destes organismos na cadeia trófica, que ao se alimentar de insetos e outros invertebrados são

responsáveis pelo controle de diversas pagas, além de servirem de alimento a serpentes, aves e mamíferos, as alterações que resultem em declínios populacionais dos anfíbios podem resultar em desequilíbrios ambientais significativos.

2.3 Estudos ecotoxicológicos em áreas contaminadas

Muitas vezes, a contaminação presente em um ecossistema se mostra imperceptível às análises químicas convencionais. Neste contexto, os estudos ecotoxicológicos buscam evidenciar a presença de contaminantes e avaliar seus efeitos sobre a biota, utilizando para isso organismos conhecidos, sensíveis a perturbações (LEBBORONI et al., 2006) e com representatividade na cadeia trófica (VASCONCELOS, 2014).

Os testes de toxicidade resumem-se na exposição de organismos selecionados às substâncias de interesse, utilizando diferentes concentrações ou tempos de exposição, com posteriores análises de sobrevivência, mortalidade, comportamento, morfologia, fisiologia e outras respostas dadas pelos organismos de acordo com o estudo (RAND; PETROCELLI, 1985). Desta forma, é possível chegar a informações como: níveis máximos de contaminantes permitidos no ambiente, grau de periculosidade; efeitos sobre a biota manifestados nos mais variados níveis (COSTA et al., 2008), como efeitos letais e subletais; alterações no desenvolvimento e reprodução; desordens comportamentais e muitos outros (BAUDO, 1987).

A exposição aguda consiste no contato do organismo com o agente químico em um evento único durante um curto período de tempo (ADAMS, 1995). É possível observar neste tipo de exposição efeitos imediatos do tóxico sobre o organismo (TOMITA; BEYRUTH, 2002), sobretudo a letalidade, resultado a partir do qual se pode determinar a concentração letal para metade da população (CL50) (RAND; PETROCELLI, 1985). Por outro lado, a exposição crônica ocorre durante um período de tempo mais longo, com concentrações menores, porém com a liberação de substâncias continuamente ou seguindo uma periodicidade. De acordo com o agente tóxico estudado, os efeitos podem ser observados rapidamente ou ao longo do ciclo de vida do organismo (TOMITA; BEYRUTH, 2002), dependendo de seu grau de toxicidade e mecanismos de ação.

Outro tipo de estudo que tem se mostrado bastante eficaz na análise dos efeitos de agentes químicos sobre a biota são os testes de comportamento. Muitas vezes, substâncias químicas introduzidas no ambiente em concentrações subletais não provocam alterações morfológicas evidentes nos organismos. Entretanto, alterações fisiológicas podem ser refletidas em mudanças de comportamento, as quais tendem a afetar o desempenho dos

organismos em seus sistemas naturais. Existem várias formas de realizar este tipo de análise, um exemplo são os testes de evitamento, onde se observa a capacidade dos organismos de evitar ambientes que apresentem concentrações elevadas do tóxico. Esse teste avalia a resposta imediata dos indivíduos a determinado xenobiótico e fornece respostas com relação à dinâmica de uma população e do ecossistema (ARAÚJO et al., 2014b). Outra maneira seria a utilização de softwares de análise de mobilidade, como o Kinovea, que possibilita a visualização da trajetória de movimentos em uma sequência de vídeo (REIS et al. 2011).

Nesse contexto, entende-se que as análises ecotoxicológicas devem ser aplicadas de maneira importante a complementar as análises químicas, de modo que, em conjunto, possam obter o melhor diagnóstico da qualidade ambiental para determinado ecossistema. Por isso, estudos ecotoxicológicos são essenciais e urgentes para a avaliação dos danos causados pelo rompimento da barragem do Fundão em Mariana-MG. Além dos efeitos imediatos, estes estudos poderão auxiliar em uma melhor compreensão dos efeitos em longo prazo e predizer como estes poderão afetar a dinâmica dos ecossistemas atingidos pela lama.

3 JUSTIFICATIVA

A atividade mineradora, apesar de apresentar aspectos econômicos positivos e importantes para o Brasil, configura-se como uma atividade extremamente impactante ao meio ambiente. Alguns dos aspectos negativos gerados por esse setor são: a retirada da vegetação e do solo natural, produção de partículas em suspensão tanto no ar quanto na água, e o lançamento de efluentes nos corpos hídricos próximos. Tais aspectos podem ocasionar diversos outros danos como erosão ou assoreamento dos corpos d'água, redução na concentração de oxigênio dissolvido e consequente diminuição da riqueza de espécies presentes no local (MECHI; SANCHES, 2010). Atualmente, o estado brasileiro que concentra o maior número de problemas relacionados ao setor de mineração é Minas Gerais, com cerca de 20% do total nacional (FERNANDES et al, 2014).

Além dos impactos causados diretamente pela extração mineral, citados anteriormente, existem outros provenientes do risco de desastres ambientais, sendo o exemplo mais recente o desastre ocorrido em novembro de 2015, na cidade de Mariana – MG. De acordo com a mineradora SAMARCO, o rejeito liberado no ambiente não apresenta compostos tóxicos em concentrações que possam causar danos à saúde humana ou ao meio ambiente, porém acredita-se que esses dados possam estar subestimados em consequência da baixa quantidade de informações científicas fornecidas por estudos na área. Desta forma, para melhor compreender a real magnitude do desastre, diversas instituições de pesquisa, ensino e órgãos ambientais, tem se dedicado a estudar a questão. Assim sendo, a realização de estudos ecotoxicológicos que avaliem as consequências negativas dos rejeitos de mineração sobre organismos chaves na cadeia trófica são de extrema importância.

Os anfíbios são organismos considerados potenciais bioindicadores de qualidade ambiental, uma vez que estão suscetíveis à contaminação tanto em ambientes aquáticos como em terrestres, devido ao ciclo de vida bifásico. Ademais, estes organismos ocupam uma parte importante na teia alimentar, de forma que distúrbios em suas populações podem afetar significativamente a dinâmica de outros taxon. Por exemplo, anfíbios anuros são predadores conhecidos de insetos alados, e seus girinos têm apresentado potencial papel predador sobre larvas de mosquitos, como o caso dos anuros *Rana tigrina* e *Ptychadena sp* (SPIELMAN; SULLIVAN, 1974; MARIN et al., 1983). Desta forma, o atual declínio populacional do grupo poderia, como uma das suas consequências de interações tróficas, resultar em um aumento na incidência de insetos, inclusive de vetores de doenças como a dengue e febre amarela.

Considerando a escassez de dados relacionados à toxicidade de contaminantes em anfíbios (FRYDAY; THOMPSON, 2012), sobretudo de rejeitos de mineração, junto à necessidade de compreender a magnitude dos danos do desastre da Barragem do Fundão, é essencial e urgente a realização de estudos ecotoxicológicos de curto e longo prazo, visando a ampliação dos dados e conhecimento sobre estratégias de conservação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este trabalho visou a avaliação dos impactos da contaminação pelo rejeito de mineração decorrente do rompimento da barragem de Fundão em Mariana - MG em anfíbios da espécie *Lithobates catesbeianus* durante o estágio de vida larval, estimando esclarecer lacunas tanto sobre as consequências atuais da contaminação na área, quanto prever consequências futuras, auxiliando em projetos de conservação e monitoramento.

4.2 Objetivos específicos

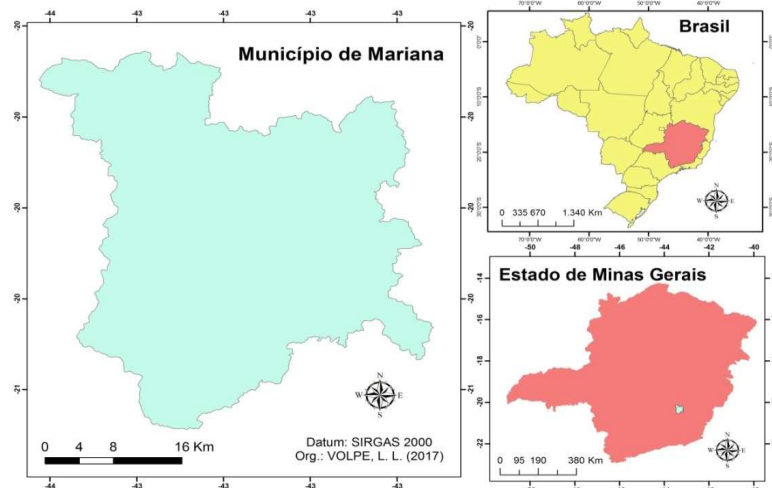
- Determinar os efeitos a curto prazo da contaminação pelo rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem do Fundão sobre a sobrevivência e capacidade natatória de girinos de *Lithobates catesbeianus* por meio de experimentos laboratoriais.
- Avaliar os efeitos a longo prazo gerados pela contaminação pelo rejeito de mineração em girinos de *Lithobates catesbeianus*, por meio da avaliação de crescimento, desenvolvimento, análises de desempenho natatório e taxa de consumo de oxigênio.
- Avaliar a capacidade de resposta de fuga dos girinos de *Lithobates catesbeianus* a ambientes contaminados por rejeito de mineração, por meio de testes comportamentais de evitamento.

5 METODOLOGIA

5.1 Área de estudo

O município de Mariana localiza-se na região centro-sul do Estado de Minas Gerais, a cerca de 100 km da capital, Belo Horizonte (Figura 1), inserida na bacia hidrográfica do Rio Doce. De acordo com o último censo do IBGE (2010), possui uma área de 1.194,208 km² e apresenta uma população de 59.343 habitantes.

Figura 1. Localização do município de Mariana no Brasil e no Estado de Minas Gerais.

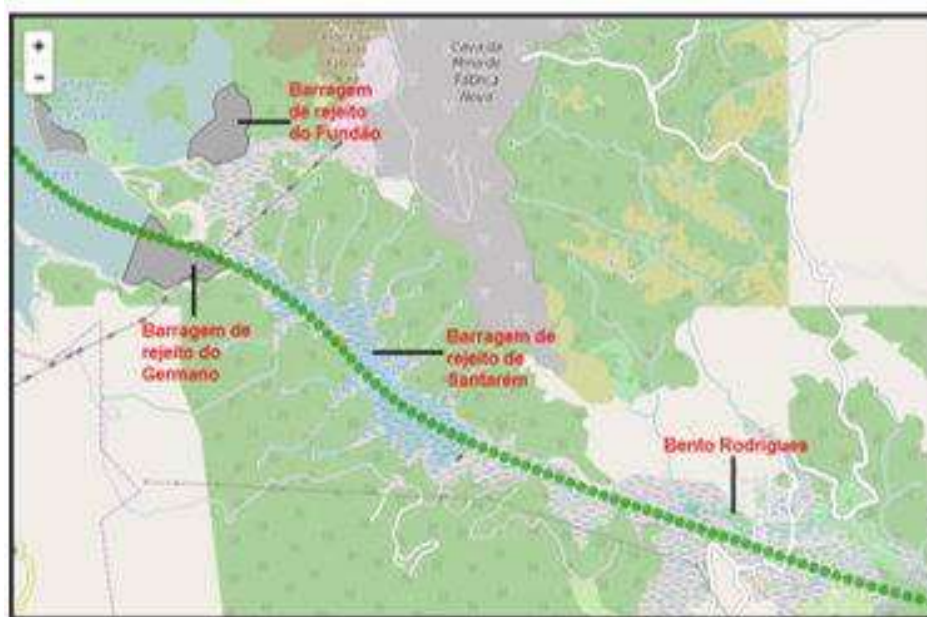


Fonte: VOLPE, L. L. (2017).

O histórico de ocupação da região é marcado pela atividade mineradora, iniciada no século XVII devido à busca por ouro no Ribeirão do Carmo. Mariana, que a princípio era denominada vila, desenvolveu-se juntamente com a mineração (SOUZA; SOBREIRA; FILHO, 2005) e atualmente, o município é constituído por 10 distritos, sendo eles: Mariana (Distrito Sede), Bandeirantes (Ribeirão do Carmo Camargos), Cachoeira do Brumado, Cláudio Manoel (Bela Vista), Furquim, Monsenhor Horta, Passagem de Mariana, Padre Viegas (Sumidoro), Santa Rita Durão e Cachoeira do Brumado (Plano Municipal de Saneamento Básico do Município de Mariana, 2014). O município está inserido na região responsável pela maior produção de minério de ferro do país, situada entre a Província Geotectônica de São Francisco e a Província Geotectônica Mantiqueira, o chamado Quadrilátero Ferrífero (SOUZA; SOBREIRA; FILHO, 2005), marcado por um relevo dobrado que sofre com a erosão, baixo na região central, alto nas bordas e com a presença de serras (SAMARCO, 2005).

As empresas que realizam a extração de minérios na região, sobretudo do minério de ferro, são a Companhia Vale do Rio Doce e a Samarco. Para a execução de tal atividade, foram construídas três barragens na região: barragem do Germano, barragem do Fundão e a barragem Santarém (Figura 2). A usina de Germano é a principal responsável pelas atividades de lavra, beneficiamento, processamento e transporte do minério, despejando os rejeitos gerados ao longo do processo na Barragem do Fundão (SAMARCO, 2013).

Figura 2. Localização das três barragens de contenção de rejeitos presentes no município de Mariana, de propriedade da mineradora SAMARCO.



Fonte: IBAMA (2015).

5.2 Coleta do rejeito contaminante para estudo ecotoxicológico

A coleta do rejeito de mineração, a ser utilizado neste trabalho, foi coletado na região atingida pelo rompimento da Barragem do Fundão, no distrito de Paracatu de Baixo, em Mariana – MG, 10 meses após o desastre, em setembro de 2016, quando nenhuma intervenção por parte da empresa responsável havia sido realizada. Os rejeitos foram transportados e armazenados, em temperatura ambiente, sem exposição à luz, no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) da Universidade de São Paulo (USP), em Itirapina – SP, onde foi realizado o presente trabalho.

De acordo com a Samarco (2005), o rejeito destinado à Barragem do Fundão continha, além de sílica, alguns poucos metais em sua composição, como ferro, alumínio e manganês

(Tabela 1). Entretanto, após o desastre, foram registrados em amostras de água, valores elevados de outros metais como chumbo (Pb), cobre (Cu) e Níquel (Ni) (Tabela 2).

Tabela 1 – Composição mineralógica dos rejeitos armazenados na Barragem do Fundão, segundo informado pela SAMARCO

Amostra	Fe	SiO ₂	Al ₂ O ₃	P	PPC*	MnO ₂
Rejeito arenoso	12,15	82,19	0,12	0,001	0,31	0,009
Rejeito argiloso	51,89	13,52	5,00	0,118	6,89	0,130

* Perda por calcinação

Fonte: SAMARCO, 2005, p. 7

Tabela 2 – Concentrações médias (mg/L) de metais detectados a montante (P1) e a jusante (P2 e P3) da barragem do Fundão após o desastre, segundo estudo de Carvalho et. al (2017).

Metal	Ponto de amostragem			VMP*
	P1	P2	P3	
Pb	0,013 ± 0,0 ^{aA}	0,097 ± 0,01 ^{bA}	0,089 ± 0,00 ^{bA}	0,033
As	0,012 ± 0,00 ^{aA}	0,911 ± 0,01 ^{cB}	0,736 ± 0,02 ^{bB}	0,033
Ni	0,051 ± 0,01 ^{aB}	1,078 ± 0,04 ^{bC}	1,056 ± 0,02 ^{bC}	0,025
Cu	0,062 ± 0,03 ^{aB}	1,115 ± 0,02 ^{bC}	1,427 ± 0,04 ^{cC}	0,013
Al	0,465 ± 0,01 ^{aC}	9,432 ± 0,09 ^{cE}	8,914 ± 0,07 ^{bD}	0,2
Mn	0,041 ± 0,02 ^{aB}	1,638 ± 0,17 ^{bD}	0,655 ± 0,58 ^{aB}	0,5

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. *VMP = Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA 357/05 para Classe III de qualidade das águas.

Fonte: CARVALHO et al. (2017)

5.3 Organismo-teste

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos da USP, situada no município de Itirapina - SP.

Foram utilizados para ambos os testes, agudos e crônicos, girinos da espécie *Lithobates catesbeianus*, no estágio 25 de Gosner (GOSNER, 1960), o qual corresponde ao estágio em que os animais perdem as brânquias e iniciam a fase de alimentação independente, além de adquirem habilidades natatórias ativas (SPARLING et al. 2010). *L. catesbeianus* é uma espécie introduzida na América do Sul para criação e comercialização de sua carne, e tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para testes ecotoxicológicos em

anfíbios. Esses girinos foram fornecidos pelo Ranário Ranamat, Matão – SP e passaram por um período de aclimação de sete dias antes do início dos experimentos.

Os girinos foram mantidos em condições laboratoriais, com controle de temperatura, cerca de $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, e fotoperíodo de 12 horas (MURTY, 1988), sob aeração constante, em caixas d'água que obedeciam a profundidade do ambiente natural, preenchidas com água de torneira declorada. A renovação de 50% da água foi realizada por meio de sifonagem a cada 48 horas. A alimentação à vontade foi realizada diariamente com ração de peixes tropicais. Por se alimentarem de forma independente e adquirirem habilidades natatórias ativas, o estágio 25 de Gosner é recomendado e o mais utilizado em testes de toxicidade em anfíbios (SPARLING et al. 2010).

Figura 3. (a) Tanques nos quais os girinos eram aclimatados; (b) Girinos de *L. catesbeianus* no tanque de aclimação.



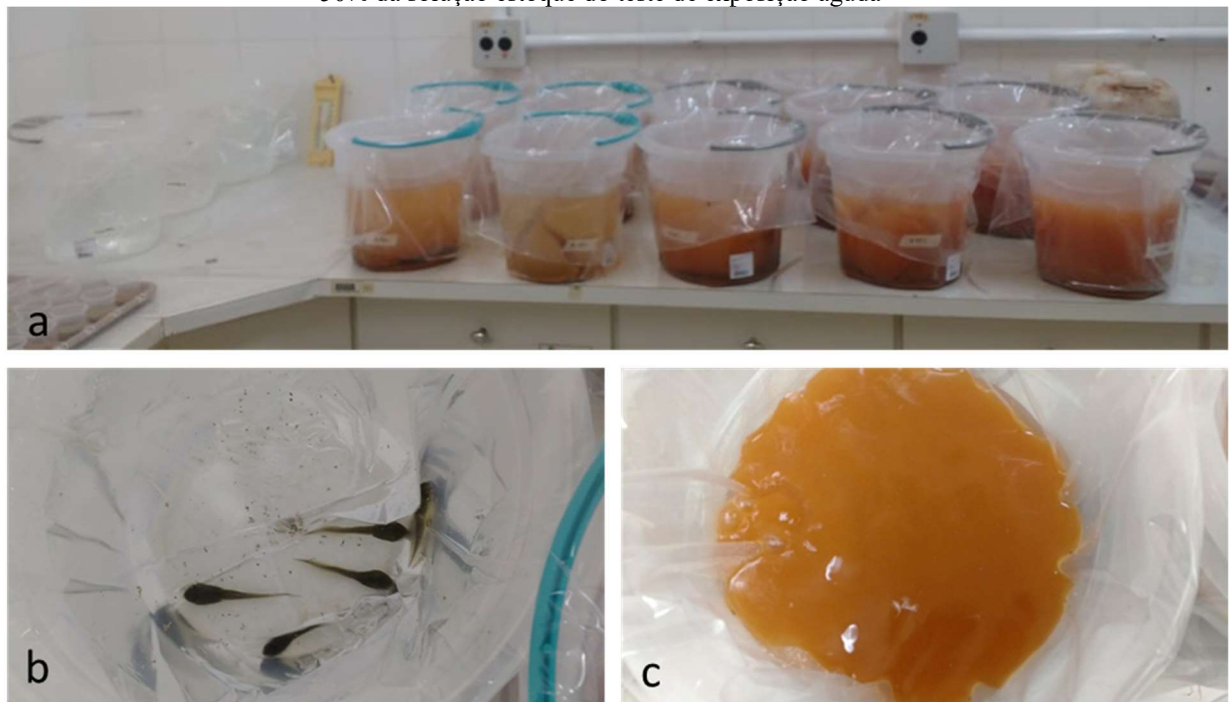
Fonte: Elaboração própria

5.4 Exposição aguda

Poucos são os estudos que avaliam a sensibilidade dos anfíbios a compostos químicos diversos, de maneira que os limites de contaminação estabelecidos para espécies mais sensíveis de peixes são também extrapolados para anfíbios durante sua fase aquática (FRYDAY; THOMPSON, 2012; HAMMOND et al., 2012). No entanto, alguns estudos indicam que, para determinadas substâncias, os valores de LC50 apresentados para anfíbios podem ser superiores ou inferiores àqueles apresentados por espécies de peixes padronizadas para tais testes (VASCONCELOS et al. 2016).

Nos testes estáticos de exposição aguda, os animais foram mantidos sem alimentação, com oxigenação constante e sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo utilizadas durante o período de manutenção dos animais em laboratório ($24 \pm 2^\circ\text{C}$, 12h:12h claro:escuro), ao longo de 96 horas. Com o rejeito, foi preparada uma solução estoque de 4420 NTU (unidades nefelométricas de turbidez), na qual utilizou-se 50 gramas de rejeito em 1 litro de solução, quantidade máxima de rejeito que não apresentou deposição imediata sob agitação. Foram analisadas, em triplicata, cinco proporções de diluição da solução estoque com o rejeito, sendo elas 10%, 25%, 50%, 75% e 100% (relação volume de solução estoque/volume total) de diluição, além do grupo controle, que não contou com a adição da solução contendo o rejeito. Cinco girinos foram inseridos em cada recipiente contendo ± 5 L da solução preparada para cada tratamento e a mortalidade dos organismos foi monitorada diariamente.

Figura 4. (a) Montagem do teste de exposição aguda com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25 de Gosner (1960); (b) réplica do controle do teste de exposição aguda; (c) réplica do tratamento composto pela diluição de 50% da solução estoque do teste de exposição aguda



Fonte: Elaboração própria

Ao início e ao término do período experimental, registrou-se o pH, oxigênio dissolvido e a condutividade, através de um pHmetro Micronal B74, oxímetro YSI 55 e condutivímetro Orion 145A+ (Figura 5). Os organismos sobreviventes foram submetidos à avaliação da mobilidade natatória (descrita no item 5.6).

Figura 5. Aparelhos utilizados para a medição dos parâmetros físico-químicos das amostras. (a) pH-metro Micronal B74 (b) oxímetro YSI 55; (c) condutivímetro Orion 145A+.



Fonte: Elaboração própria.

5.5 Exposição crônica

A partir dos resultados de mortalidade obtidos no teste de exposição aguda, foram definidas as porcentagens de diluição de rejeito nas quais os girinos foram expostos durante os testes crônicos. Como não foi registrada mortalidade após o teste agudo para nenhum dos tratamentos, os organismos foram expostos a 25%, 50% e 100% (proporção solução estoque/solução total) durante períodos mais prolongados para avaliação de toxicidade crônica a níveis subletais. Foram realizados dois testes crônicos, um com 16 dias de exposição teste crônico 1) e o outro com 20 dias (teste crônico 2). Optou-se pela realização de um teste com 20 dias dado o surgimento da oportunidade de testar efeitos nas taxas respiratórias dos girinos, além da realização de análises de biomarcadores. Dessa forma, os resultados dos dois testes crônicos serão apresentados no presente trabalho de maneira separada.

O teste crônico 1 consistiu então de três tratamentos, além do controle, representados por 4 réplicas, cada uma contendo 6 girinos no estágio 25 de Gosner (GOSNER, 1960). O peso final médio dos girinos foi de $0,233 \pm 0,069$ g. Para o desenvolvimento do experimento, os girinos foram distribuídos em bandejas de dimensões 442 x 280 x 75mm, contendo 5 litros de solução com oxigenação constante. As condições de temperatura e fotoperíodo utilizados durante os testes crônicos são os mesmos daqueles descritos anteriormente para o teste agudo

(temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12:12 claro/escuro). A alimentação foi realizada a cada 2 dias, enquanto a solução foi renovada completamente a cada 4 dias. Os parâmetros físico-químicos iniciais e finais da água foram registrados anteriormente e posteriormente a cada troca, utilizando os mesmos equipamentos descritos para o teste de exposição aguda.

Figura 6. (a) Montagem do teste de exposição crônica 1 com girinos de *L. catesbeianus* no estágio 25 de Gosner (1960); (b) réplicas do controle do teste de exposição crônica 1; (c) réplicas do tratamento composto pela diluição de 25% da solução estoque do teste de exposição crônica 1;



Fonte: Elaboração própria

Ao final dos 16 dias, os girinos sobreviventes passaram pelo teste de análise de mobilidade (descrito no item 5.6) e em seguida foram eutanasiados em solução de 15% de fenoxietanol e conservados em formol 10%, para posteriores análises morfológicas (descritas no item 5.5.1).

O segundo teste crônico foi conduzido da mesma maneira descrita anteriormente, porém com duração de 20 dias, no qual foram introduzidos 5 organismos por réplica ($n = 20$), com peso médio final de 2,558 g. Ao final do período experimental, quatro dos girinos de cada tratamento ($n = 4$) foram submetidos à análise de respirometria (descrito no item 5.8), onde avaliou-se a taxa de consumo de oxigênio ($\text{mg O}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$), enquanto os demais organismos foram eutanasiados e tiveram suas medidas do peso e tamanho tomadas, assim como identificação do estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1990), para realização das análises morfológicas (descritas no item 5.7). Por fim, amostras do fígado e da cauda foram

coletadas de cada indivíduo para análise de biomarcadores, submersos imediatamente em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C .

Figura 7. Coleta do fígado e músculo da cauda de girinos de *L. catesbeianus* expostos por 20 dias a concentrações subletais do rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem do Fundão.



Fonte: Elaboração própria.

5.5.1 Análises morfológicas

Para a obtenção da taxa de crescimento individual dos girinos expostos cronicamente ao rejeito de mineração, foram tomadas medidas do comprimento rostro-cloacal com paquímetro de precisão (0.001mm), e o peso foi registrado utilizando uma balança analítica (0,0001g). Em seguida, cada girino teve o estágio de desenvolvimento identificado de acordo com a classificação de Gosner (1960).

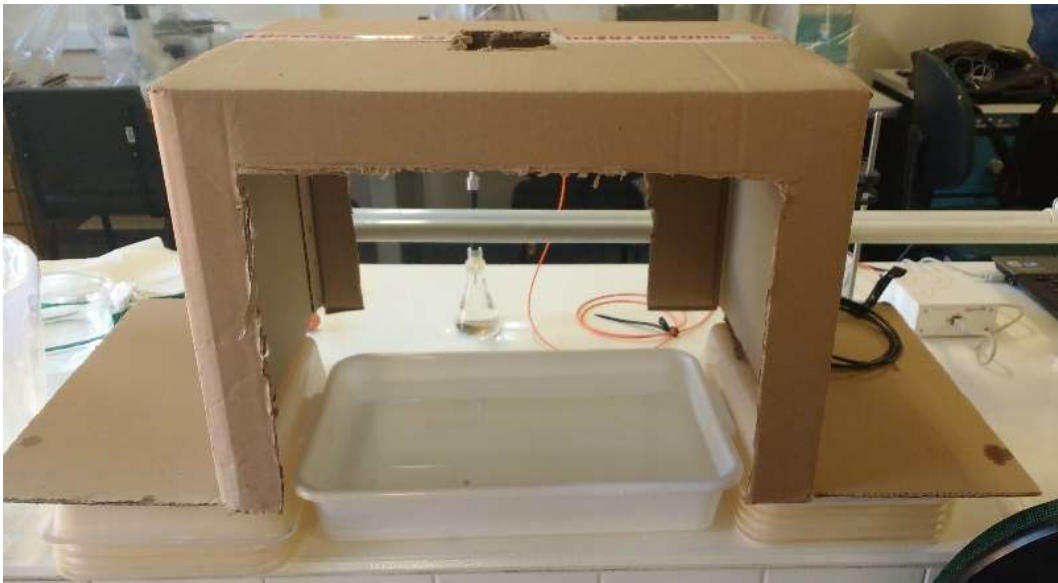
5.6 Análise de mobilidade

A análise de mobilidade foi realizada para compreender os efeitos gerados pela exposição aos contaminantes após um período de exposição crônica dos girinos. Existem diversos softwares que permitem, além de traçar as trajetórias, quantificar os movimentos de natação em organismos aquáticos, convertendo-os em dados que possam ser quantificados. Diferentemente de softwares pagos, o Kinovea é um software livre utilizado para análise de vídeos com organismos em movimento e que possui diversas ferramentas que permitem a obtenção de dados como trajetória de um ponto, velocidade, angulação e muitos outros (REIS et al., 2011). Apesar de ser comumente utilizado para análise de movimentos humanos, o teste

já foi empregado com sucesso em análises de efeitos crônicos em peixes expostos a contaminantes por Khayrullin et al. (2016), e no presente estudo foi observado eficácia também para girinos.

O teste foi conduzido adaptando a metodologia utilizada por Khayrullin et al. (2016) em peixes-zebra (*Danio rerio*) para girinos expostos ao rejeito de mineração durante os testes laboratoriais. Após os períodos de exposição de 96 horas (exposição aguda), 16 dias e 20 dias (exposição crônica) os animais foram transferidos, individualmente, para recipientes (442 x 280 x 75mm) contendo água limpa e sem contaminante, e tiveram sua natação registrada através de uma câmera de celular ao longo de 1 minuto, após três estímulos de toque. Por fim, os vídeos foram analisados com as ferramentas fornecidas pelo software Kinovea v. 0.8.26 (<https://www.kinovea.org/>), e os dados de distância percorrida e velocidade máxima de natação obtidos foram examinados e comparados entre os tratamentos.

Figura 8. Estrutura utilizada para gravação dos vídeos de comportamento para análises de mobilidade natatória em girinos de *L. catesbeianus* expostos ao rejeito de mineração.



Fonte: Elaboração própria.

5.7 Respirometria

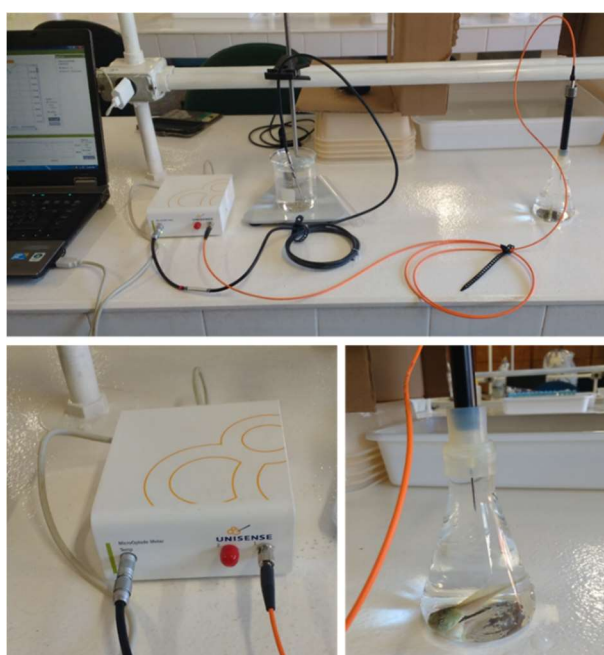
A análise da respiração dos indivíduos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 20 dias foi realizada através da adaptação do método utilizado por MASSARIN et al. (2010) para *Daphnia magna*. Foram analisados 4 indivíduos de cada tratamento, os quais foram colocados individualmente em frascos erlenmeyers contendo 300 mL do meio de teste filtrado. Utilizando o sensor do sistema de microrespiração Unisense (Unisense S/A, Arhus,

Dinamarca) foi registrada a diminuição da pressão parcial do oxigênio, associada à respiração do organismo ao longo de 15 minutos. O sensor foi calibrado utilizando um meio líquido saturado de oxigênio, além de uma solução de ascorbato de sódio (0,1 M) em NaOH (0,1 M), a qual não apresentava oxigênio dissolvido (MASSARIN et. al., 2010). Converteu-se a porcentagem de saturação em concentração de oxigênio através da concentração de equilíbrio na água de 282,3 mol O₂/L (20 °C, 1 atm). As taxas de consumo de oxigênio (R) (mol O₂/organismo*h) foram calculados por meio da Equação 1.

$$R = \frac{[O_2]_0 \times (1 - \exp^{-k \times \Delta t}) \times V}{\Delta t} \quad \text{[EQUAÇÃO 1]}$$

Na equação, [O₂]₀ trata-se da concentração de oxigênio (mol/L) medida no tempo t = 0, V o volume (L) de meio na câmara de respiração (0,3 L), Δt = 0,25h e k foi o coeficiente de consumo (h⁻¹) obtido ao ajustar modelos exponenciais às concentrações observadas de oxigênio: [O₂]_t = [O₂]₀ × exp(-k × t). Multiplicando a taxa de consumo de oxigênio (R) pela massa molar do O₂ (32 g/mol), obteve-se um R em (g O₂/organismo*h). Ao dividir esse valor pelo peso em gramas de cada indivíduo, obteve-se a taxa de consumo de oxigênio por grama de organismo (g O₂/g organismo*h).

Figura 9. Montagem e equipamentos utilizados para análise da taxa de consumo de oxigênio (respirometria) de girinos de *L. catesbeianus* expostos a concentrações subletais de rejeito de mineração.



Fonte: Elaboração própria.

5.8 Teste de evitamento

O teste consistiu em uma adaptação da metodologia proposta por ARAÚJO et al. (2014), isto é, um sistema compartimentado em seis frascos de 300 mL interligados entre si (Figura 10). Inicialmente, as interligações foram vedadas por massa de modelar não tóxica, em seguida foram adicionadas as diferentes diluições do rejeito e os girinos, no estágio 25 de Gosner. Posteriormente, as massas de modelar foram removidas, permitindo a livre passagem dos animais e sua movimentação livre entre os gradientes. Após 12h de escuridão, foi verificada a distribuição dos indivíduos ao longo dos compartimentos (ARAÚJO et al., 2014b).

Para avaliação da estabilidade do sistema, o mesmo foi previamente calibrado utilizando NaCl, nas concentrações de 0mg/L, 17mg/L, 33mg/L, 50mg/L, 66mg/L e 83mg/L em cada compartimento, e a condutividade foi medida no momento $t = 0$ horas e $t = 12$ horas. Subsequentemente, para confirmar se os girinos não apresentavam preferência por qualquer um dos compartimentos, foi realizado um teste controle contendo apenas água sem cloro, sem estabelecimento de um gradiente entre compartimentos sucessivos, onde foram introduzidos 3 girinos de *L. catesbeianus* em cada compartimento e após 12 horas verificou-se a distribuição destes.

Após a calibração, o teste foi conduzido adicionando diferentes diluições de uma solução estoque de rejeito coletado após desastre (50g de rejeito/L - 4500 UNT), em porcentagem de 10%, 25%, 50%, 75% e 100%, além do compartimento controle, em compartimentos sucessivos visando estabelecer um gradiente de concentração/diluição ao longo do sistema. Além disso, foram adicionados 3 girinos em cada compartimento e, por fim, a interligação entre os compartimentos foi liberada.

O experimento foram realizados à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e no escuro, para evitar que a locomoção dos organismos fosse induzida pela presença de luz (ARAÚJO et al., 2014a, 2014b). Ao final das 12 horas, analisou-se a distribuição dos girinos ao longo dos compartimentos e determinou-se a “porcentagem de evitamento” dos mesmos (ARAÚJO et al., 2014a, 2014b). Análises físico-químicas da água foram mensuradas no início e ao término do experimento. O teste foi realizado em quadruplicata.

No teste com contaminação, contendo o gradiente de concentrações de rejeito de mineração, determinou-se o número esperado de organismos em um dado compartimento (NEsp) através da Equação 2.

$$NEsp = NInt + NMig \quad [EQUAÇÃO 2]$$

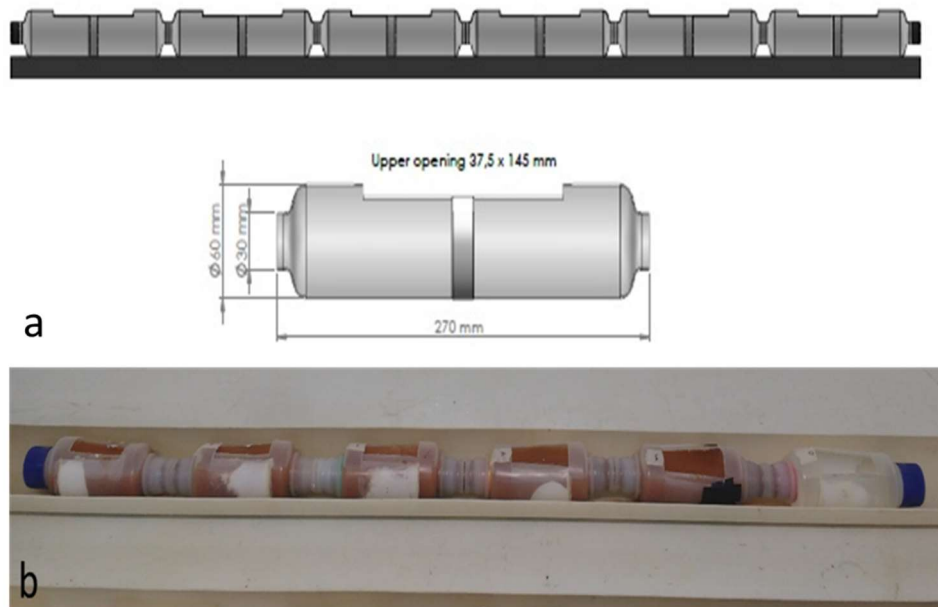
Onde, $NInt$ é o número de organismos introduzidos no compartimento e $NMig$ o número de organismos imigrantes do compartimento adjacente de maior concentração. A partir disso, foi possível calcular o número de evasores ($NEva$) por meio da Equação 3.

$$NEva = NEsp - NObs \quad [EQUAÇÃO 3]$$

Onde $NEsp$ é o número de organismos esperados no compartimento, e $NObs$ é o número de organismos observados ao final do período experimental. Por fim, a porcentagem de evitamento de cada compartimento foi determinada por meio da Equação 4.

$$\%Evitamento = \frac{NEva}{NEsp} \quad [EQUAÇÃO 4]$$

Figura 10. (a) Representação esquemática do sistema de evitamento (avoidance) (b) Adaptação do sistema de “avoidance” utilizado para análise comportamental dos girinos de *L. catesbeianus* à exposição ao rejeito de mineração.



Fonte: a) MOREIRA et al. (2018); b) Elaboração própria.

5.9 Análise estatística

Para os testes de exposição crônica, as médias do peso e tamanho corporal, assim como a taxa de respiração dos girinos expostos às diferentes concentrações de rejeito foram comparadas àquelas do controle. A existência de valores discrepantes (*outliers*) foi verificada, a normalidade dos dados foi testada através de Shapiro-Wilk (LEHNER, 1996). Esses dados foram comparados por análise de variância ANOVA-one-way, seguida de teste pos hoc (Tukey-Kramer $p < 0,05$) para dados paramétricos, e teste de comparações Kruskal-Walis para dados não paramétricos ($p < 0,05$). Para a avaliação do efeito do rejeito de mineração sobre o desenvolvimento dos girinos utilizou-se o teste G (G-test of goodness-of-fit) com correção de Yates (SOKAL, 1995).

5.10 Quantificação dos metais

A quantificação dos metais presentes na solução estoque inicial (50g/L de rejeito), assim como nas amostras finais do controle e dos tratamentos (10%, 25%, 50%, 75% e 100%) foram realizados em parceria com o laboratório do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de engenharia de São Carlos (ESSC/USP), de acordo com a 23ª edição do Standard Methods. O método utilizado para a detecção de Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Zn e Co foi o SMWW 3111B, enquanto para o Al foi utilizado o método SMWW 3111D. Ambos os procedimentos são realizados por espectrofotometria direta por absorção atômica, no qual a quantidade de luz absorvida foi medida, de forma que cada metal absorve um comprimento de onda específico (MIRANDA, 2017). Assim, a quantidade de energia absorvida, no dado comprimento de onda, é proporcional à concentração do elemento na amostra (MIRANDA, 2017).

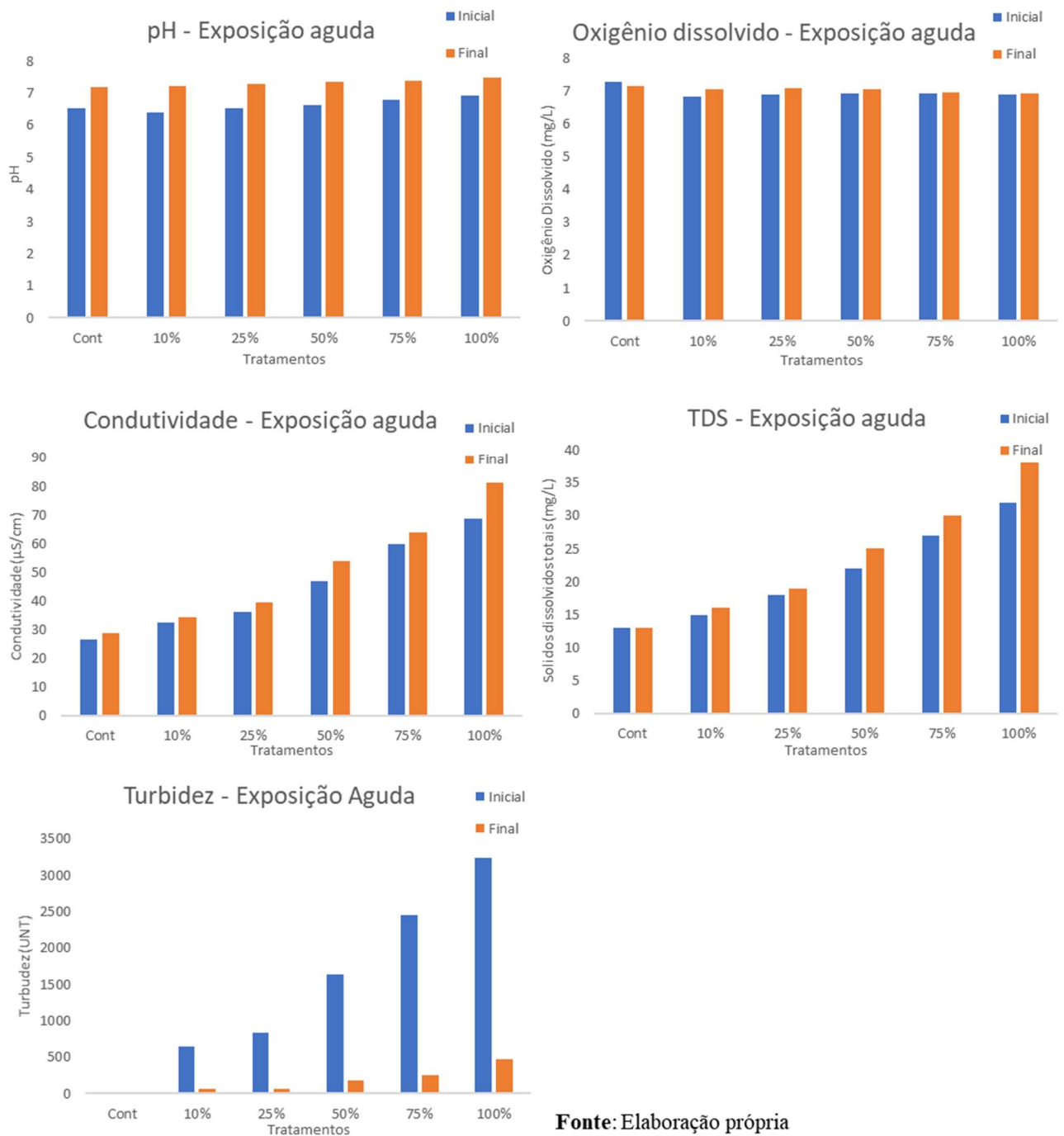
6 RESULTADOS

6.1 Exposição aguda

Os parâmetros físicos e químicos, aferidos ao início e ao final do período experimental, expostos na Figura 11, mostram que o pH apresentou um ligeiro aumento, porém manteve-se em uma faixa neutra, com valor mínimo de 6,40 e máximo de 7,48. As concentrações de oxigênio dissolvido mantiveram-se próximas umas das outras, com valor mínimo e máximo de 6,83mg/L e 7,14mg/L, respectivamente. A condutividade aumentou com a proporção de solução estoque contendo o rejeito de mineração para cada solução, apresentando valores iniciais para o controle, 10%, 25%, 50%, 75% e 100% de 6,53 μ S/cm, 6,4 μ S/cm, 6,54 μ S/cm, 6,62 μ S/cm, 6,78 μ S/cm e 6,92 μ S/cm, respectivamente. Além disso, a condutividade também apresentou um aumento ao longo do período experimental, apresentando valores finais para o controle, 10%, 25%, 50%, 75% e 100% de 7,18 μ S/cm, 7,23 μ S/cm, 7,29 μ S/cm, 7,35 μ S/cm, 7,39 μ S/cm e 7,48 μ S/cm. A concentração de sólidos dissolvidos totais, assim como a condutividade, apresentou um aumento crescente de acordo com a concentração de rejeito de mineração, o controle, 10%, 25%, 50%, 75% e 100% apresentaram valores iniciais de 13mg/L, 15 mg/L, 18 mg/L, 22 mg/L, 27 mg/L e 32 mg/L, assim como ao longo do experimento com valores finais de 13 mg/L, 16 mg/L, 19 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L e 38 mg/L, respectivamente.

Por fim, os valores de turbidez aumentaram de acordo com o tratamento, chegando a 3240UNT na porcentagem de 100% de solução estoque, passando para 2450UNT, 1640UNT, 840UNT, 640UNT e 0UNT, para os tratamentos de 75%, 50%, 25%, 10% e o controle, respectivamente. Porém com a deposição do rejeito ao longo do período experimental, a turbidez diminuiu significativamente ao final das 96h em todos os tratamentos, apresentando valores de 0UNT, 68UNT, 60UNT, 182UNT, 251UNT e 466UNT, para o controle, 10%, 25%, 50%, 75% e 100%, respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Parâmetros físicos e químicos dos tratamentos e controle no qual foram expostos girinos de *L. catesbeianus* ao rejeito de mineração, aferidos ao início e ao final do período experimental agudo (96 horas).



6.1.1 Letalidade

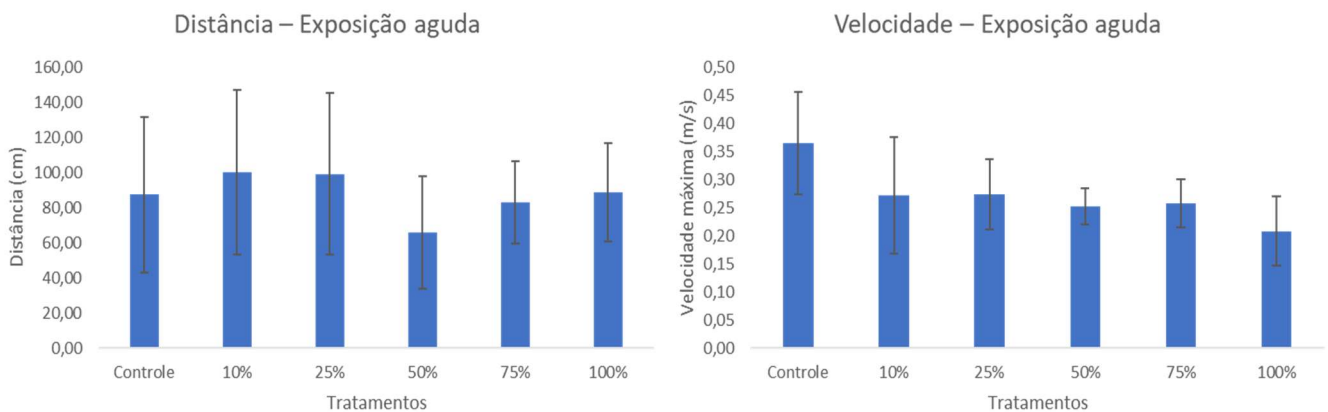
Não foi constatada letalidade dos girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ao rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem do Fundão, em Mariana (MG), ao longo de 96 horas. Desta forma, os efeitos de turbidez e diferentes quantidades de metais

encontrados (detalhes das concentrações dos metais no item 6.6) em todas as diluições testadas foram consideradas subletais.

6.1.2 Análise de mobilidade

Não houve diferença na distância total percorrida pelos girinos expostos ao rejeito quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$). Por outro lado, com relação à velocidade máxima de natação, os girinos expostos ao tratamento contendo 100% de solução estoque (50g/L de rejeito) apresentaram uma diminuição na média da velocidade máxima de natação (0,21m/s) em relação ao controle (0,36 m/s) ($p = 0.0031$) (Figura 12).

Figura 12. Capacidade natatória (distância percorrida e velocidade máxima de natação) de girinos de *L. catesbeianus* expostos por 96 horas ao rejeito de mineração.



(*) indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 – Valores de p para teste de multi-comparação Kruskal-Wallis, em relação à velocidade máxima de natação por girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 96 horas.

	Cont	10%	25%	50%	75%	100%
Cont	-	0,334879	1,000000	0,095938	0,237890	0,003132(*)
10%	0,334879	-	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
25%	1,000000	1,000000	-	1,000000	1,000000	0,152790
50%	0,095938	1,000000	1,000000	-	1,000000	1,000000
75%	0,237890	1,000000	1,000000	1,000000	-	1,000000
100%	0,003132(*)	1,000000	0,152790	1,000000	1,000000	-

(*) valores que se mostraram significativos ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria

6.2 Teste de evitamento

Após o período de 12 horas no sistema multicompartimentado, os girinos presentes em cada um dos compartimentos foram quantificados e os resultados estão expostos na Tabela 7. Os tratamentos foram constituídos pelas diluições graduais 10, 25, 50, 75 e 100%) da solução estoque do rejeito.

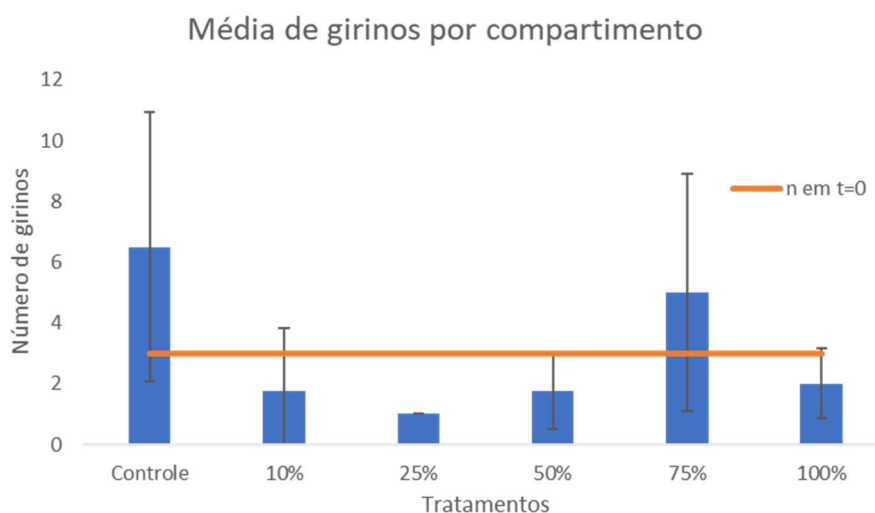
Tabela 4 – Número de girinos presente em cada compartimento ao final das 12 horas do teste de evitamento.

Réplica	Controle	10%	25%	50%	75%	100%
Sistema 1	4	0	1	3	7	3
Sistema 2	12	4	1	0	0	1
Sistema 3	8	0	1	2	4	3
Sistema 4	2	3	1	2	9	1

Fonte: Elaboração própria

A partir destes dados, foi possível calcular a média de girinos presente em cada compartimento ao final do período experimental de 12 horas (Figura 13).

Figura 13. Média de girinos de *L. catesbeianus* presente em cada compartimento contendo diferentes diluições do rejeito de mineração ao final do período experimental de 12 horas.



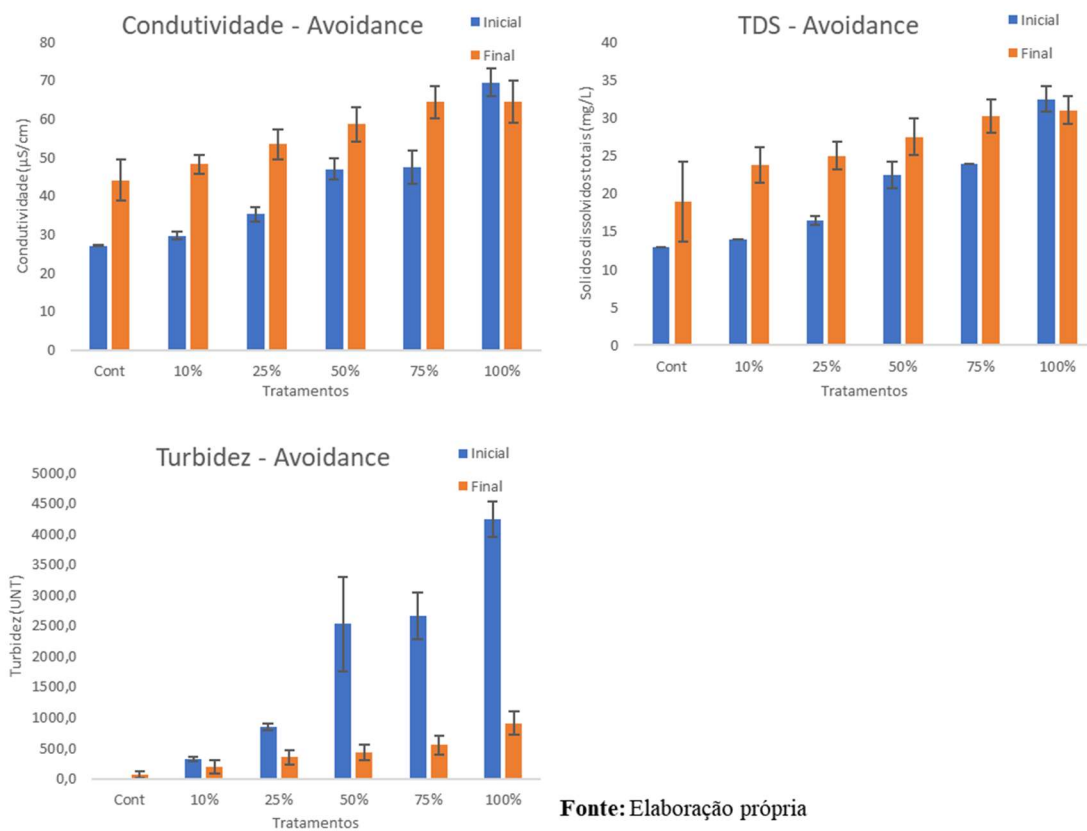
Fonte: Elaboração própria.

Desta forma, calculou-se a média da taxa de evitamento dos girinos entre os diferentes compartimentos. Os resultados apresentados pelos compartimentos do controle e dos tratamentos de 10%, 25%, 50%, 75% e 100% de solução estoque foram respectivamente 18,61% \pm 17,33, 74,11% \pm 35,40, 78,33% \pm 10,41, 58,04% \pm 41,58, 40,48% \pm 42,33 e 16,68%

$\pm 33,35$. Percebe-se que a taxa de evitamento é maior onde o rejeito está mais diluído (diluições de 10 e 25%), e menor nos extremos do sistema.

É possível afirmar que o sistema se mostrou eficiente em manter o gradiente de concentrações ao longo do período experimental pois tanto a condutividade, quanto os sólidos dissolvidos totais e a turbidez permaneceram crescentes ao longo do experimento e de acordo com as porcentagens das diluições, como mostra a Figura 14.

Figura 14. Média da condutividade, sólidos dissolvidos totais e turbidez das quatro réplicas do sistema de avoidance no qual foram expostos girinos de *L. catesbeianus* ao rejeito de mineração, aferidas ao início e final do período experimental de 12 horas.

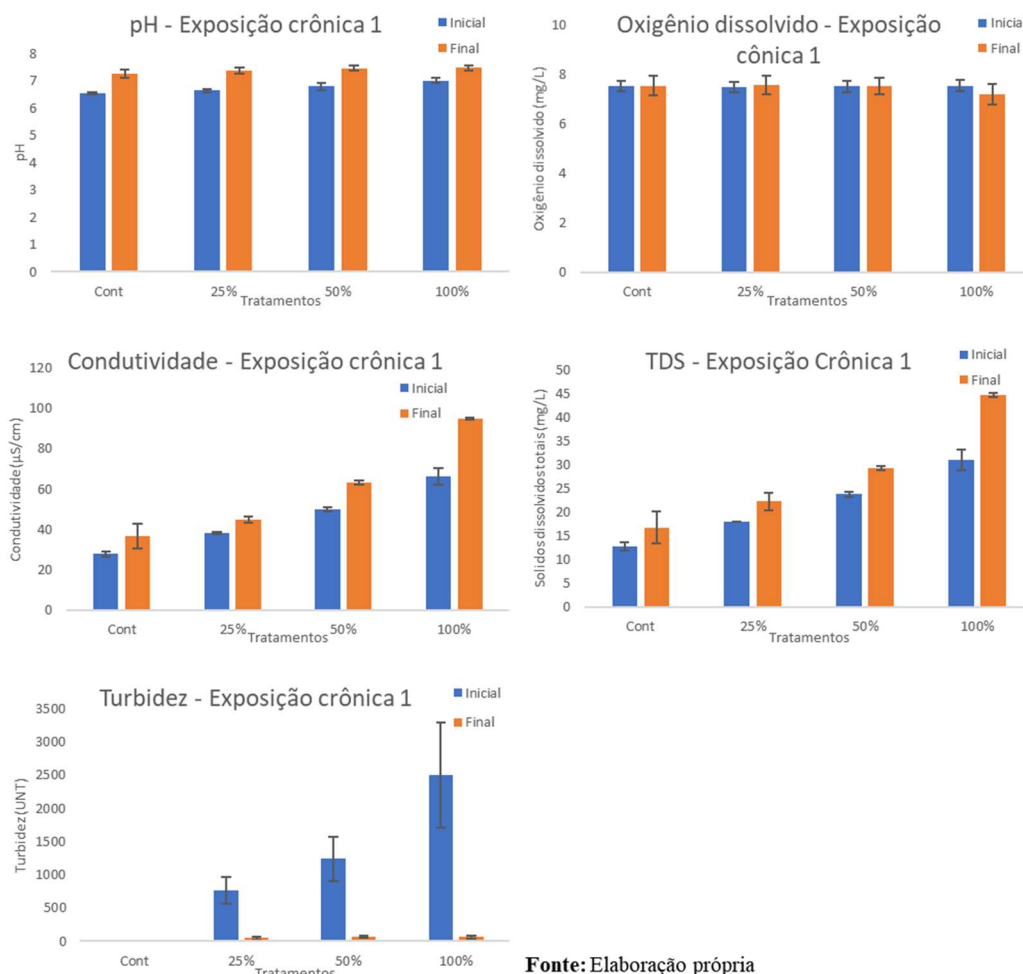


6.3 Exposição crônica 1 (16 dias)

A média dos parâmetros físicos e químicos, expostos na Figura 15, aferidos ao início e ao final de cada renovação de solução (4 dias), mostram um padrão semelhante ao exibido ao longo da exposição aguda, com um ligeiro aumento de pH, porém mantendo-se em uma faixa neutra. As concentrações de oxigênio dissolvido foram consideradas aceitáveis e sem grandes diferenças entre os tratamentos. Os valores de condutividade aumentaram com a porcentagem de solução estoque contendo o rejeito de mineração, de forma que os valores médios iniciais para o controle, 25%, 50% e 100% foram respectivamente 28,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 38,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 50,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$

e 66,3 μ S/cm, assim como ao longo do período experimental, apresentando valores finais de 36,8 μ S/cm, 44,8 μ S/cm, 63,0 μ S/cm e 94,9 μ S/cm, respectivamente. Com um comportamento similar à condutividade, a concentração de sólidos dissolvidos totais apresentou um aumento relacionado à proporção de solução estoque, com concentrações médias iniciais de 12,7mg/L, 18,0mg/L, 23,7mg/L e 31,0mg/L para o controle, 25%, 50% e 100%, além de apresentar um aumento ao longo do experimento, apresentando médias finais respectivamente, 16,7mg/L, 22,2mg/L, 29,2mg/L e 44,7mg/L. Por fim, a turbidez também aumentou de acordo com a tratamento apresentando valores médios iniciais de 0UNT, 760UNT, 1237,5UNT e 2500UNT, para o controle, 25%, 50% e 100%. Entretanto, devido à deposição do rejeito ao longo do tempo, a turbidez final foi significativamente menor, com valores médios de 2,2UNT, 43,0UNT, 62,7UNT e 57,7UNT. Ao passo que a água foi renovada a cada 96h, como mencionado anteriormente, esses resultados físico-químicos foram condizentes com àqueles apresentados para o teste de exposição aguda.

Figura 15. Média dos parâmetros físico e químicos dos tratamentos e controle no qual foram expostos girinos de *L. catenbeianus* ao rejeito de mineração, aferidos a cada renovação de solução (96 horas), da exposição crônica 1, de duração de 16 dias.



Fonte: Elaboração própria

6.3.1 Letalidade

Alguns girinos morreram ao longo dos 16 dias do período experimental, como mostra a Tabela 5. Entretanto, não foi o suficiente para determinar a letalidade do rejeito de mineração.

Tabela 5 – Número de mortes e sobreviventes dos girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 16 dias.

Tratamento	Mortes	Sobreviventes	Total
Controle	1	23	24
25%	2	22	24
50%	0	24	24
100%	1	23	24

Fonte: Elaboração própria

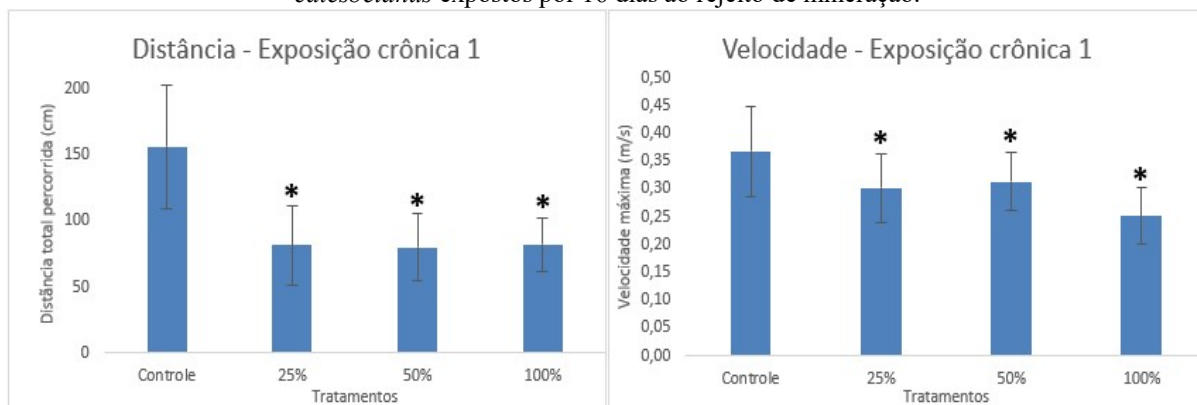
6.3.2 Análise de mobilidade

Após o período experimental de 16 dias, a mobilidade natatória dos girinos de *Lithobates catesbeianus* foi alterada em todos os tratamentos, tanto em relação à distância total percorrida, quanto à velocidade máxima de natação, como observado na Figura 16.

A distância média percorrida pelos girinos expostos aos tratamentos correspondentes à 25%, 50% e 100% de solução estoque contendo rejeito de mineração foram respectivamente de 77,53 cm, 78,42 cm e 84,39 cm, sendo todas significativamente menores ($p < 0,05$) que a distância percorrida pelos girinos controle, que foi de 156,42 cm. Entretanto os tratamentos não mostraram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

Com relação à velocidade máxima de natação, os girinos expostos aos tratamentos de 25%, 50% e 100% apresentaram média de 0,30m/s, 0,30m/s e 0,26m/s, respectivamente. Estes valores foram significativamente menores ($p < 0,05$) que a velocidade média atingidas pelos girinos do grupo controle, correspondente à 0,37m/s. Além disso, os girinos expostos ao tratamento contendo 100% de solução estoque (50g/L de rejeito) também apresentaram velocidade significativamente inferior quando comparados aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

Figura 16. Capacidade natatória (distância percorrida e velocidade máxima de natação) de girinos de *L. catesbeianus* expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.



(*) significância estatística ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 – Valores de p para teste de multi-comparação Kruskal-Wallis da distância percorrida por girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 16 dias.

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	0,000001(*)	0,000002(*)	0,000042(*)
25%	0,000001(*)	-	1,000000	1,000000
50%	0,000002(*)	1,000000	-	1,000000
100%	0,000042(*)	1,000000	1,000000	-

(*) valores que se mostraram significativos ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria

Tabela 7 – Valores de p para teste de Tukey para comparar a velocidade máxima de natação dos girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 16 dias.

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	0,008235(*)	0,004976(*)	0,000145(*)
25%	0,008235(*)	-	0,999751	0,040918(*)
50%	0,004976(*)	0,999751	-	0,044707(*)
100%	0,000145(*)	0,040918(*)	0,044707(*)	-

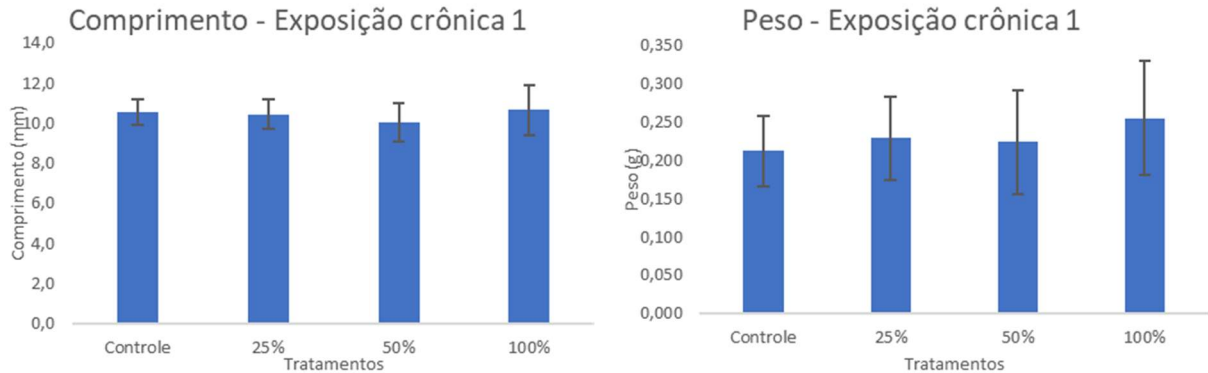
(*) valores que se mostraram significativos ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria

6.3.3 Análises morfológicas

Como pode ser observado na Figura 17, não houve diferença nos pesos e comprimento de girinos expostos a nenhum dos tratamentos em relação aos girinos do grupo controle.

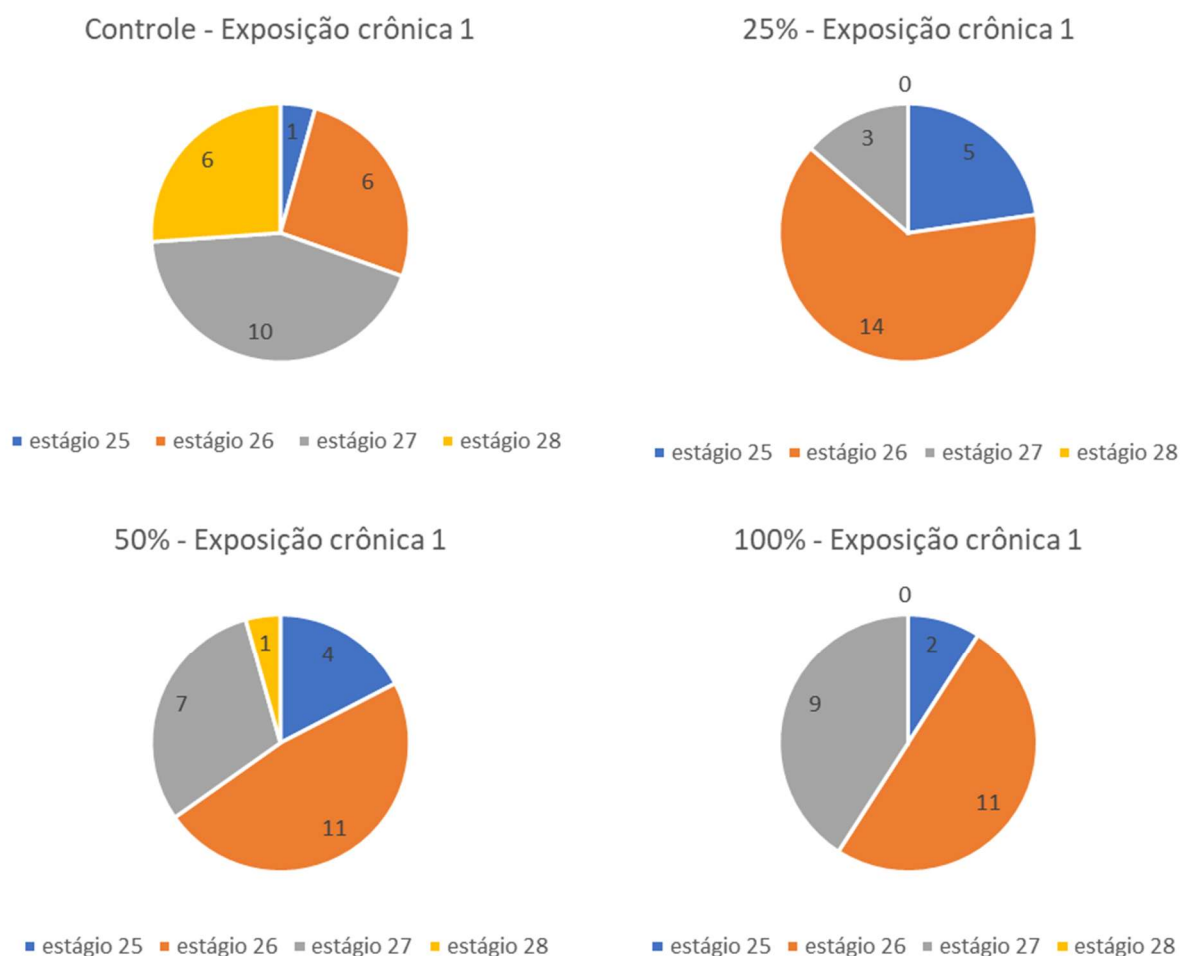
Figura 17. Comprimento e peso finais de girinos de *L. catasbeianus* expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.



Fonte: Elaboração própria

Com relação ao desenvolvimento, como pode ser observado na Figura 18, o controle apresentou o menor número de organismos no estágio 25G (apenas 1 girino), e o maior número nos estágios 27G e 28G, com 10 e 6 girinos cada, respectivamente. Por outro lado, todos os tratamentos contendo rejeito de mineração apresentaram um número maior de girinos ainda no estágio 25G, mesmo após 16 dias do período experimental. Além disso, o estágio que se mostrou mais presente nos tratamentos foi o 26G. Por fim, apenas um girino no estágio 28G foi identificado dentre todos os girinos expostos ao rejeito (tratamento de 50%). Apesar disso, de acordo com o teste G (G-test of goodness-of-fit) com correção de Yates (SOKAL, 1995), não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e o controle.

Figura 18. Estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos girinos de *L. catenbeianus* expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.



Fonte: Elaboração própria.

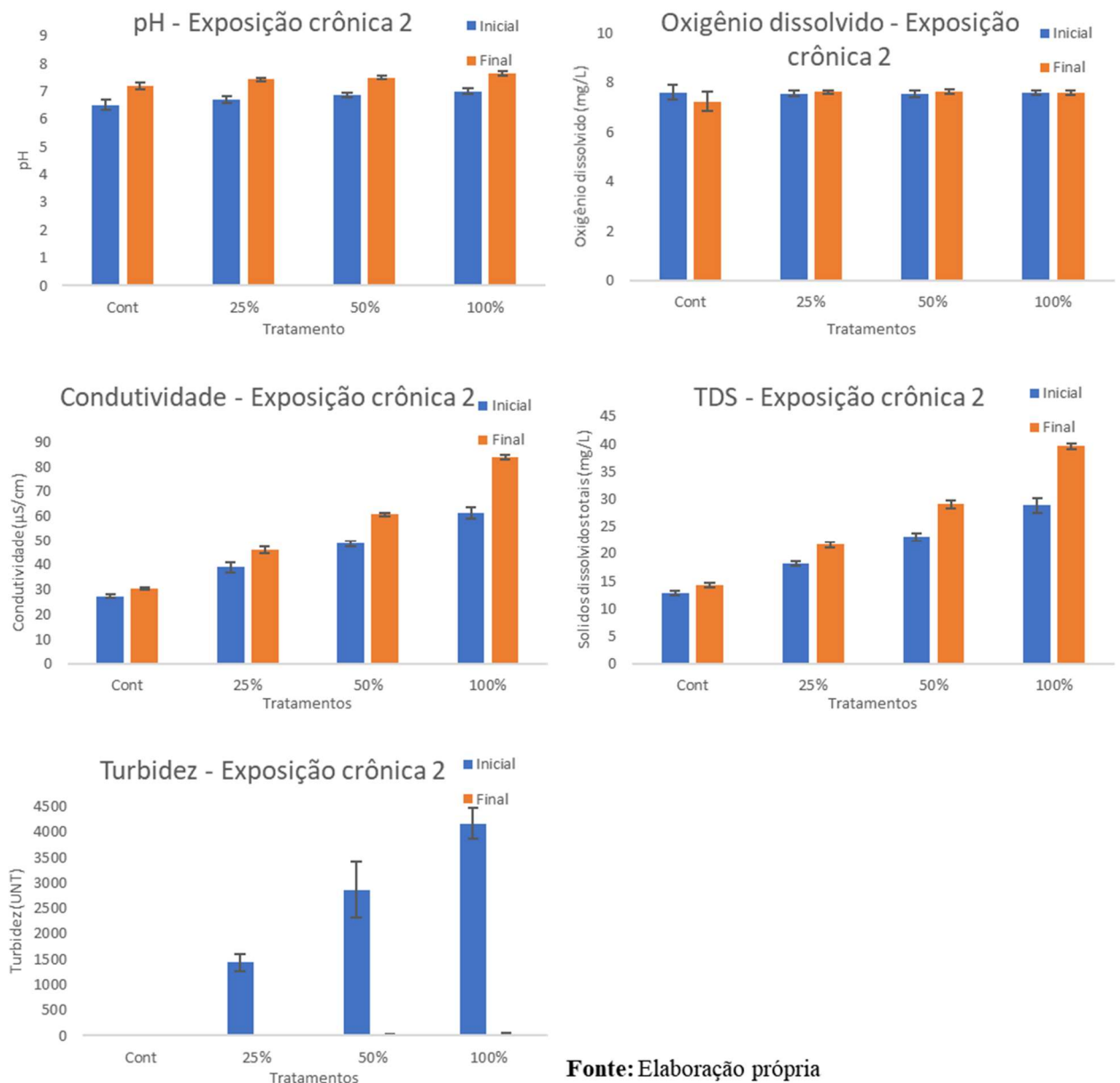
6.4 Exposição crônica 2 (20 dias)

Da mesma forma que a exposição crônica 1, a exposição crônica 2 foi conduzida utilizando as diluições de 25%, 50% e 100% da solução estoque (aproximadamente 4000UNT), a partir dos resultados obtidos na exposição aguda.

As médias dos parâmetros físicos e químicos das soluções estão expostos na Figura 19, que mostra um comportamento semelhante ao ocorrido ao longo das exposições aguda e crônica 1 (16 dias). O pH manteve-se em uma faixa neutra, apesar de apresentarem ligeiro aumento ao longo do tempo experimental. As concentrações de oxigênio dissolvido permaneceram em uma faixa aceitável. A condutividade aumentou de acordo com a porcentagem de solução, desta forma, os valores iniciais obtidos para o controle, 25% 50% e 100% foram de, respectivamente, 27,2 μ S/cm, 38,9 μ S/cm, 48,7 μ S/cm e 61,3 μ S/cm. Um

aumento ao longo do período experimental pode ser observado através dos valores médios finais, sendo eles $30,4\mu\text{S}/\text{cm}$, $46,2\mu\text{S}/\text{cm}$, $60,4\mu\text{S}/\text{cm}$ e $82,7\mu\text{S}/\text{cm}$. Um comportamento semelhante foi observado para a concentração de sólidos dissolvidos totais (TDS). Observa-se isso ao comparar os valores iniciais de $12,8\text{mg}/\text{L}$, $18,2\text{mg}/\text{L}$, $23,0\text{mg}/\text{L}$ e $28,8\text{mg}/\text{L}$, e os valores finais de $14,2\text{mg}/\text{L}$, $21,6\text{mg}/\text{L}$, $29,0\text{mg}/\text{L}$ e $39,6\text{mg}/\text{L}$, respectivamente para o controle, 25%, 50% e 100%. Por fim, a turbidez apresenta da mesma forma um aumento relacionado à quantidade de rejeito, porém, devido à deposição do rejeito ao longo do período experimental, esses valores foram reduzidos drasticamente ao final do teste.

Figura 19. Média dos parâmetros físico e químicos dos tratamentos e controle no qual foram expostos girinos de *L. catesbeianus* ao rejeito de mineração, aferidos a cada renovação de solução (96 horas), da exposição crônica 2, com duração de 20 dias.



Fonte: Elaboração própria

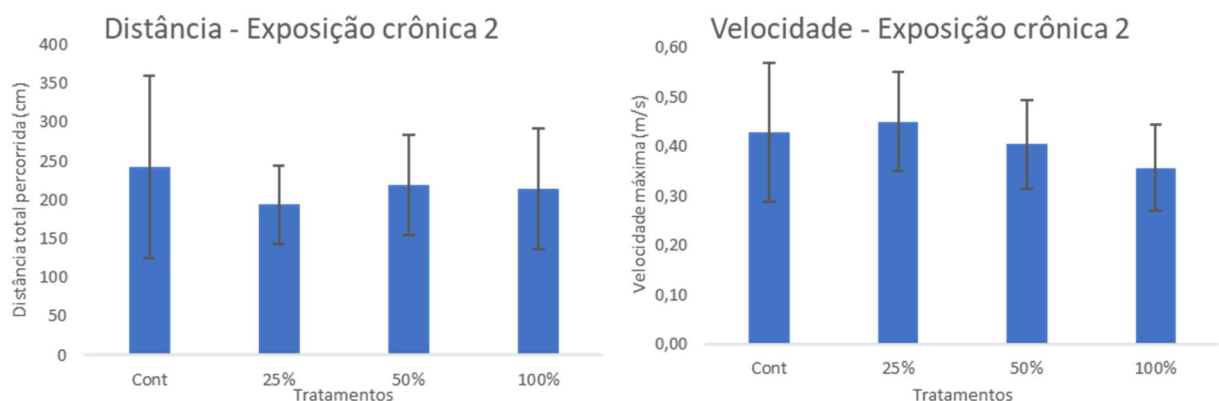
6.4.1 Letalidade

Não foi constatada nenhuma morte ao longo do período experimental de 20 dias da exposição crônica 2, desta forma, os tratamentos contendo rejeito de mineração como contaminante não causou mortalidade.

6.4.2 Análise de mobilidade

Após o período experimental de 20 dias, diferentemente do teste de exposição crônica 1, a mobilidade natatória dos girinos de *Lithobates catesbeianus* exposto ao rejeito de mineração no teste crônico 2, não apresentou alteração significativa ($p > 0,05$) tanto em relação à distância total percorrida, quanto em relação à velocidade máxima de natação, como observado na Figura 20.

Figura 20. Capacidade natatória (distância percorrida e velocidade máxima de natação) de girinos de *L. catesbeianus* expostos por 20 dias ao rejeito de mineração.



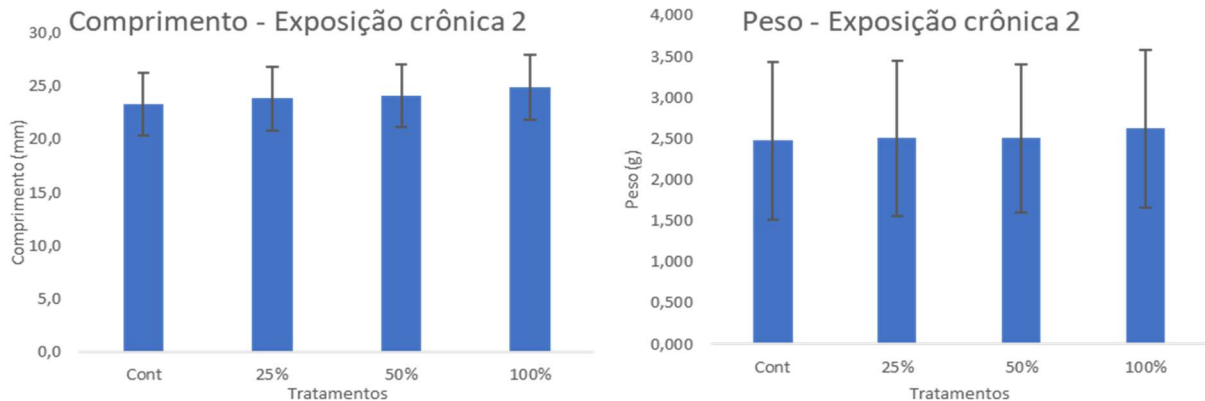
(*) significância estatística ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

6.4.3 Análises morfológicas

De forma semelhante ao obtido no teste crônico 1, como pode ser observado na Figura 21, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no peso e comprimento de girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo dos 20 dias da exposição crônica 2.

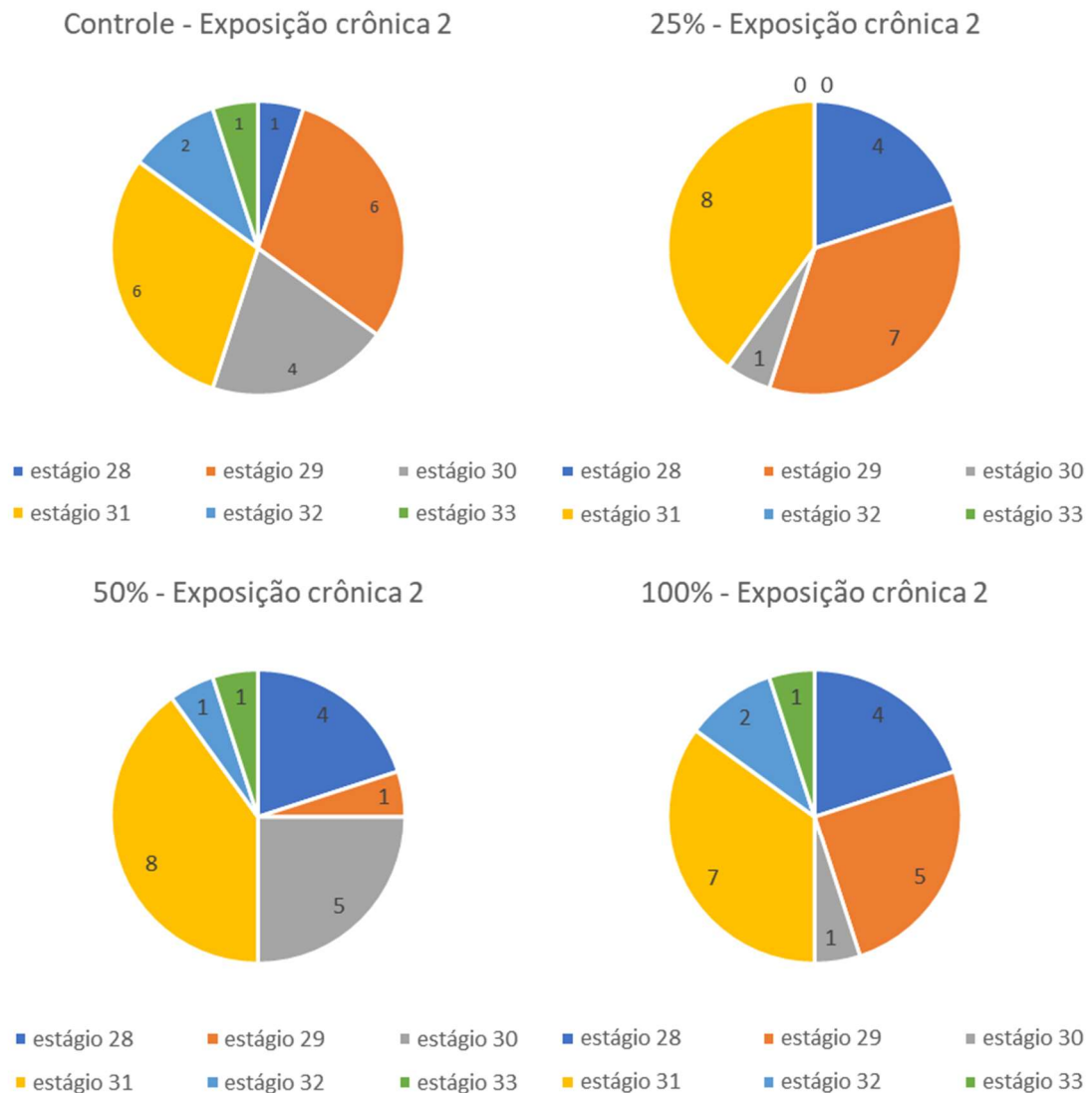
Figura 21. Comprimento e peso finais de girinos de *L. catesbeianus* expostos por 16 dias ao rejeito de mineração.



Fonte: Elaboração própria

Com relação ao desenvolvimento, ao final do período experimental de 20 dias da exposição crônica 2, foram encontrados girinos em estágios de desenvolvimento mais avançados do que os girinos da exposição crônica 1. Neste caso, como pode ser observado na Figura 21, o controle apresentou o menor número de girinos no estágio 28G (apenas 1 girino), enquanto todos os tratamentos, 25%, 50% e 100%, apresentaram 4 girinos neste estágio. O único tratamento no qual não foram encontrados girinos nos estágios 32G e 33G foi o composto por 25% de solução estoque (50mg/L de rejeito de mineração). Apesar disso, de acordo com o teste G (G-test of goodness-of-fit) com correção de Yates (SOKAL, 1995), não houve diferença significativa entre nenhum dos tratamentos e o controle ($p = 0,2319$).

Figura 22. Estágio de desenvolvimento segundo Gosner (1960) dos girinos de *L. catesbeianus* expostos por 20 dias ao rejeito de mineração.

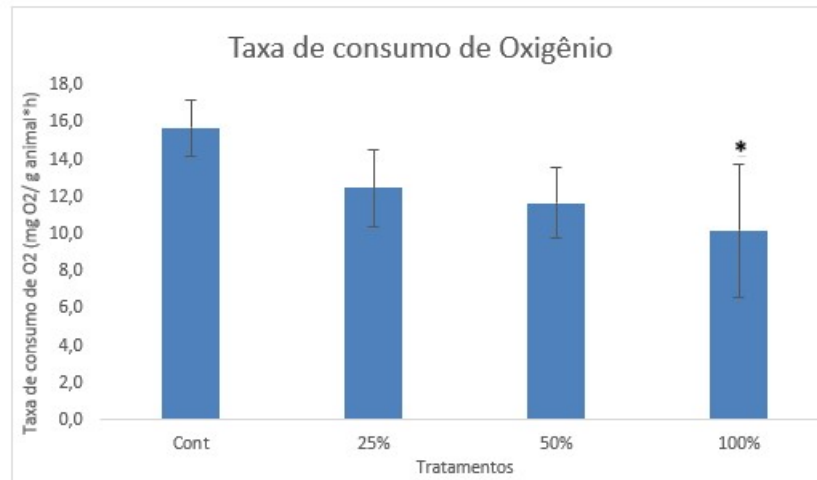


Fonte: Elaboração própria.

6.4.4 Respirometria

Após um segundo experimento de exposição crônica, o qual foi conduzido durante 20 dias, os girinos expostos ao tratamento contendo 100% de solução estoque apresentaram uma redução da taxa de consumo de oxigênio de 10,177 mg O₂/g*h, com metade daquela apresentada pelos animais do grupo controle (22,308 mg O₂/g*h) ($p = 0,030205$) (Figura 23). Porém, não houve diferença na taxa de consumo de oxigênio entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 23. Taxa de consumo de oxigênio por grama de animal dos girinos de *L. catesbeianus* expostos por 20 dias ao rejeito de mineração.



(*) significância estatística ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria

Tabela 8 – Valores de p para teste de Tukey para comparar a taxa de consumo de oxigênio de girinos expostos ao rejeito de mineração ao longo de 20 dias.

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	0,273212	0,132945	0,030205(*)
25%	0,273212	-	0,963688	0,553072
50%	0,132945	0,963688	-	0,818201
100%	0,030205(*)	0,553072	0,818201	-

(*) valores que se mostraram significativos ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria

6.5 Biomarcadores

Devido a um problema técnico, o freezer -80°C no qual as amostras de fígado e cauda dos girinos expostos ao rejeito de mineração por 20 dias foram conservadas descongelou, impossibilitando a utilização das amostras para os ensaios de biomarcadores.

6.6 Quantificação dos contaminantes

Para compreender melhor as causas dos resultados obtidos, é necessário conhecer os contaminantes presentes no rejeito. A Tabela 9 exhibe a concentração final dos metais encontrados no rejeito proveniente do rompimento da Barragem do Fundão em cada tratamento utilizado em nossos testes laboratoriais, assim como a concentração inicial da solução estoque.

Foram quantificados diversos metais presentes no rejeito, entretanto, apenas seis estavam dentro do limite de detecção do aparelho. Os metais que se apresentaram em maior quantidade foram o Ferro (Fe) e o Alumínio (Al), seguidos do Manganês (Mn), Zinco (Zn), Chumbo (Pb) e Cádmio (Cd). A solução estoque (Legenda: 100% inicial) apresentou as maiores concentrações de metais em relação aos demais tratamentos/diluições, assim como esperado. Esses dados provenientes das análises químicas permitem inferir que girinos expostos às diferentes diluições do rejeito, foram também expostos a diferentes concentrações de metais, sendo elas proporcionais às taxas de diluição.

Tabela 9 – Concentração de metais encontrada nos tratamentos utilizados para a exposição de girinos de *L. catesbeianus* ao rejeito de mineração.

Contaminante	Controle	10%	25%	50%	75%	100%	100% inicial
Cádmio (mg/L)	0,004	0,004	0,003	0,007	0,007	0,007	0,007
Chumbo (mg/L)	-	-	-	0,01	0,03	0,05	0,10
Ferro (mg/L)	-	1,162	1,551	4,739	6,440	11,790	29,23
Manganês (mg/L)	-	0,046	0,037	0,087	0,110	0,176	3,32
Zinco (mg/L)	0,051	0,062	0,045	0,058	0,068	0,069	0,080
Alumínio (mg/L)	-	0,05	0,09	0,43	0,59	1,21	3,91

7 DISCUSSÃO

Os testes de exposição aguda e crônica mostraram que, nas condições obtidas em laboratório e, avaliando somente a mortalidade dos girinos de *L. catesbeianus* como *endpoint*, o rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem do Fundão poderia ser classificado como não tóxico por não causar mortalidade nas exposições aguda e crônicas. Porém, observou-se alterações tanto em aspectos comportamentais quanto fisiológicos, relacionados às taxas de respiração. Os metais encontrados nas amostras foram, em ordem de significância $Fe > Al > Mn > Pb > Zn > Cd$, e suas concentrações contidas na solução estoque de rejeito (50g/L) obtida para os testes laboratoriais foram, respectivamente, de 29,23mg/L, 3,91 mg/L, 3,32 mg/L, 0,10mg/L, 0,080 mg/L e 0,007mg/L. De acordo com Shuhaimi-Othman et al. (2012), as concentrações letais (LC_{50} , 96h) dos metais testados isoladamente em girinos de *Duttaphrynus melanostictus* foram de 1,9mg/L para Al, 39mg/L para Mn, 1,5mg/L para Pb, 4,2mg/L para Zn e 0,3 mg/L para Cd, todas superiores àquelas encontradas em qualquer uma das amostras dos tratamentos com rejeito, porém para o Fe a concentração letal foi significativamente menor, sendo de 0,4 mg/L, sendo quase três vezes menor do que a concentração encontrada no tratamento de 10% (1,162 mg/L). Entretanto, não se sabe qual a relação do Fe presente nas amostras com as partes sólidas do rejeito, assim como são escassos os estudos que consideram estes metais quando presentes em mistura para anfíbios, de forma que os efeitos podem ser sinérgicos ou antagônicos.

Apesar da contaminação por rejeito de mineração testada em condições de laboratório não ter causado a morte dos girinos de *L. catesbeianus*, alterações fisiológicas e comportamentais foram observadas em animais expostos aos diferentes tratamentos, principalmente àqueles mantidos na maior concentração (100% de solução estoque). Esses resultados podem ser consequência tanto das condições alteradas dos parâmetros físico-químicos da água, como pela exposição crescente às concentrações de metais disponíveis na fração aquosa, as quais foram evidenciadas pelas análises químicas. Diversos são os efeitos tóxicos desencadeados por exposição aos metais em anfíbios durante sua fase de vida aquática, como por exemplo, reduções na capacidade natatória, alterações na taxa de crescimento, atraso ou aceleração no desenvolvimento, redução da taxa de respiração, ocorrência de estresse oxidativo, entre outros (GROSS; CHEN; KARASOV, 2007; JAMES; LITTLE, 2003; JUNG; JAGOE, 1995; MARCANTONIO, 2015; VERONEZ et al., 2016).

Com relação à velocidade máxima de natação, girinos de *L. catesbeianus* tornaram-se mais lentos na presença do rejeito em relação aos animais do grupo controle, mesmo ao longo de uma exposição de curto prazo. Estes efeitos são intensificados quando os organismos são submetidos a uma exposição crônica, de forma que a capacidade natatória como um todo, isso é, tanto a distância total percorrida, quanto a velocidade máxima de natação, foram significativamente menores que àquelas observadas em girinos do grupo controle. Nos estudos de Jung & Jagoe (1995), foi observado que o Al em condições de baixo pH, foi também responsável pela diminuição no desempenho natatório em girinos de *Hyla cinerea*, ao reduzir a taxa de crescimento dos organismos. Em girinos de *Rana pipiens*, a exposição ao cádmio não apresentou efeito significativo sobre a velocidade natatória de indivíduos, apesar desse metal agir como competidor antagonista da liberação de Ca^{2+} nas terminações nervosas das junções neuromusculares em anuros pré-sináptico (COOPER; MANALIS, 1984; GROSS; CHEN; KARASOV, 2007). Em peixes os metais também exercem efeitos comportamentais. Foi constatado, por exemplo, que o zinco pode causar hiperatividade e aumento na velocidade natatória (SHIRER et al., 1968; BENGTTSSON, 1974; ELLGAARD et al. 1978), da mesma forma que o cádmio e o chumbo (MORGAN, 1979). Por outro lado, o alumínio pode apresentar uma redução na atividade locomotora nos peixes contaminados (OGILVIE & STECHEY, 1983; FREEMAN; EVERHAT, 1971; SCHOFIELD; TROJNAR, 1980). Desta forma, como mostrado em estudos prévios, a exposição aos diferentes metais pode causar alterações de comportamento, bem como provocar efeitos indiretos que alterem a capacidade natatória em girinos, e essas respostas parecem ser específicas em diferentes espécies de anfíbios. A diminuição no desempenho natatório em girinos de rã touro observada nesse estudo pode ser consequência da suspensão dos metais presentes no rejeito em água, onde são disponibilizados e absorvidos diretamente pela pele desses animais, a qual é altamente permeável durante a fase de vida larval. Vale ressaltar que os efeitos observados sob o comportamento desses animais, bem como nas taxas de respiração, podem ser ainda decorrentes dos efeitos de exposição às misturas dos diferentes metais, e não apenas ao efeito isolado de determinado contaminante, uma vez que as análises químicas determinaram a presença de pelo menos seis tipos de metais no rejeito de Mariana.

As consequências das alterações comportamentais em âmbito ecológico são diversas. A diminuição do desempenho natatório dos girinos, por exemplo, pode levar a uma maior taxa de predação (JUNG; JAGOE, 1995), uma vez que, quando mais lentos, podem ter complicações para fugir de um predador. Outra consequência gerada pela diminuição da distância percorrida pelo organismo seria dificuldade em encontrar fontes de alimento. Em

uma escala mais ampla, os efeitos subletais constatados podem causar o decaimento populacional das espécies de anfíbios locais, gerando um desequilíbrio ecossistêmico.

Aspectos morfológicos gerais, tais como taxas de crescimento e desenvolvimento dos girinos expostos ao rejeito de mineração, não foram alterados tanto após exposição aguda como crônica. Entretanto, estudos avaliando toxicidade de metais em anfíbios tem mostrado que esses contaminantes podem causar alterações na metamorfose, diminuindo ou acelerando este processo. Por exemplo, estudos de Veronez et al., (2016), mostraram que os metais ferro e magnésio em concentrações subletais são capazes de induzir um atraso na metamorfose de girinos de *L. catesbeianus*. Além disso, segundo Jung & Jagoe (1995), o alumínio foi capaz de reduzir a taxa de crescimento de girinos de *Hyla cinerea*. Por outro lado, o cádmio agiu de maneira oposta sobre os mesmos aspectos em *Rana pipiens* e *Bufo americanus*, provocando um aumento na taxa de crescimento e aceleração do desenvolvimento desses girinos (GROSS; CHEN; KARASOV 2007; JAMES; LITTLE, 2003). Os efeitos morfológicos provocados por exposição a metais em anfíbios parecem depender das concentrações e condições da exposição, bem como da vulnerabilidade das espécies e o tempo de metamorfose tomado por elas para completar o processo. Tanto o atraso, quanto a aceleração do desenvolvimento, são considerados interferentes ecológicos na sobrevivência de anfíbios adultos, uma vez que podem, respectivamente, aumentar a vulnerabilidade de larvas à predadores por períodos prolongados de exposição ou gerar adultos menores e mais fracos devido à menor aquisição e estoque de energia.

Outro efeito subletal do rejeito de mineração observado no presente estudo foi a redução da taxa de consumo de oxigênio dos indivíduos expostos à contaminação. De acordo com Marcantonio (2015), o zinco é um elemento que estimula a formação de um muco sobre a pele de girinos de *L. catesbeianus* e que pode interferir na troca gasosa destes animais, que ocorre em grande parte por via dérmica (STORER & USINGER, 1979; LIMA & AGOSTINHO, 1989). Além disso, os efeitos diretos de toxicidade de exposição aos metais podem ter provocados danos fisiológicos nos girinos, os quais, conseqüentemente, tiveram suas taxas respiratórias reduzidas quando expostos ao rejeito. A diminuição da taxa respiratória em girinos pode trazer diversos efeitos para anfíbios em sistemas naturais além do processo de trocas de gases, tais como mudanças no desempenho e eficácia de movimento em corpos d'água diversos. De fato, nossos resultados mostraram que a exposição ao rejeito de mineração provocou diminuição nos movimentos natatórios e velocidades de natação dos girinos após exposição de 16 dias, principalmente quando expostos a concentrações mais elevadas dos metais. Dados bioquímicos seriam importantes para esclarecer lacunas

fisiológicas sobre como a presença e interação dos metais presentes no rejeito atuam para induzir alterações em tais aspectos fisiológicos e comportamentais. Com avaliação de possibilidades futuras, esses testes serão repetidos para as análises dos biomarcadores bioquímicos, as quais haviam sido propostas inicialmente neste trabalho.

Outra questão em relação aos metais é a alta probabilidade de acumulação nos tecidos dos organismos expostos. Sabe-se que, quando acumulados em girinos de *L. catesbeianus*, o ferro e o manganês induzem o estresse oxidativo, acarretando em efeitos genotóxicos, como danos ao DNA dos eritrócitos e aumento na frequência de micronúcleos, além de outros efeitos bioquímicos (VERONEZ et al., (2016). O chumbo, por sua vez, também é acumulado nos tecidos dos girinos e pode ser biomagnificado ao longo da cadeia trófica, sendo encontrado em potenciais predadores (BIRDSALL; GRUE; ANDERSON, 1986). Embora o acúmulo desses metais nos tecidos dos girinos não tenha sido avaliado nesse estudo, a base literária é suficientemente vasta para indicar os possíveis problemas ambientais apresentados pela exposição de animais aquáticos a metais ao longo da cadeia trófica. Essas são questões importantes e deveriam ser alvo de maior atenção para a região do município de Mariana, MG, bem como para áreas adicionais atingidas pelo desastre. Até o momento, estudos destinados a avaliar a bioacumulação e biomagnificação desses metais em organismos expostos à área do desastre são escassos e muito pouco discutidos. A falta de dados dificulta estimar de forma mais precisa os efeitos futuros do desastre tanto para biodiversidade como para saúde humana.

Por fim, os resultados provenientes do teste de evitamento (ou avoidance) mostraram que os girinos não evitaram os compartimentos com presença de rejeito, mas preferencialmente optaram pelas extremidades do sistema, tanto pelo ambiente limpo (controle) quanto pelo ambiente mais contaminado (tratamentos 75% e 100%), evitando as concentrações intermediárias. Araújo et al., (2014) mostrou em estudos prévios que girinos de *L. catesbeianus* possuem a capacidade de evitar ambientes expostos a certos contaminantes, tais como o cobre e alguns agrotóxicos. O mesmo padrão comportamental não foi observado de forma clara no presente estudo, provavelmente devido à baixa toxicidade do rejeito gerada pelas diluições testadas em laboratório. Evitar ambientes contaminados pode ser considerado uma estratégia importante de sobrevivência para animais aquáticos em áreas perturbadas pela ação humana. O comportamento observado nesse estudo, no qual girinos não evitam locais influenciados pela presença do rejeito, aumentam as chances de exposição aos diversos metais presentes na fase aquosa e da intensificação de efeitos subletais desencadeados por esses compostos, inclusive em mistura. Isso é principalmente preocupante para anfíbios durante o

estágio de vida larval, que além de apresentarem alta permeabilidade cutânea, como mencionado anteriormente, também apresentam capacidade de deslocamento relativamente baixa quando comparada a outros vertebrados aquáticos, como peixes. Essas características intrínsecas do grupo, combinada à baixa habilidade de evitamento de locais expostos pelo rejeito, oferecem motivos fortes de preocupação para conservação de espécies nativas locais tanto no município de Mariana, como nas demais áreas atingidas.

Atualmente, três anos após a avalanche de lama, com a impossibilidade de remoção dos milhões de metros cúbicos de rejeito depositados ao longo da bacia do Rio Doce, a realidade em que toda a biodiversidade está submetida é de uma exposição subletal e de longo prazo. Além disso, é preciso ressaltar que as condições obtidas em laboratório não foram tão severas quanto àquelas ocorridas no dia 05 de novembro de 2015, quando ocorreu o rompimento da Barragem do Fundão. Portanto, devemos ter em mente que os efeitos, tanto agudos quanto crônicos, constatados no presente trabalho podem ser ainda mais severos em escala real. Além disso, no ambiente natural existem diversos outros estressores aos quais os girinos estão submetidos, tais como variação de temperatura, pH e outros parâmetros físico-químicos, além de predadores, competição por alimento e a presença de outros contaminantes, os quais poderiam sensibilizar ainda mais os organismos (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002), intensificando os efeitos adversos causados pelo rejeito. Nesse trabalho, ressaltamos a carência e a necessidade de estudos avaliando os riscos da exposição de anfíbios, bem como da biodiversidade em diferentes níveis tróficos, aos rejeitos de mineração nas áreas afetadas pelo desastre.

8 CONCLUSÕES FINAIS

Considerando os objetivos estabelecidos e os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se.

- i. O rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem do Fundão não apresentou efeito agudo letal sobre girinos de *L. catesbeianus*.
- ii. Foi possível observar efeitos subletais sobre a capacidade natatória dos girinos mesmo em uma exposição de curto prazo (96 horas), por meio da diminuição da velocidade máxima de natação na maior concentração testada.
- iii. Os efeitos subletais são potencializados após exposição crônica, de forma que, tanto a velocidade máxima de natação, quanto a distância total percorrida diminuíram significativamente em todas as concentrações testadas após 16 dias de exposição.
- iv. Após 20 dias de exposição, foi constatada a diminuição da taxa de consumo de oxigênio por grama de animal em girinos expostos à maior concentração de rejeito.
- v. Não foi constatada diferença no crescimento e desenvolvimento entre os girinos expostos ao rejeito e o controle.
- vi. O teste de evitamento mostrou que os girinos buscam os extremos do sistema, fugindo das concentrações intermediárias para o controle ou para concentrações mais elevadas, podendo permanecer em ambiente contaminado e estando suscetível à intensificação dos efeitos da contaminação pelo rejeito de mineração.
- vii. O presente trabalho trata-se de um estudo prévio, outros estudos mais profundos devem ser realizados para compreender ainda mais as consequências ambientais do desastre.

9 SUGETÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando as experiências adquiridas ao longo da realização do presente trabalho, são apresentadas a seguir sugestões de trabalhos a serem realizados futuramente, para avaliação dos efeitos da contaminação ambiental por rejeito de mineração proveniente do rompimento da Barragem do Fundão sobre os anfíbios.

- i. Realizar análises de biomarcadores, tais como enzimas de estresse oxidativo e acetilcolinesterase, para compreender melhor os efeitos da contaminação por rejeito sobre os organismos.
- ii. Realizar estudos utilizando espécies nativas da região atingida pelo desastre, para comparar com a espécie modelo utilizada no presente estudo.
- iii. Realizar outros estudos introduzindo, além da contaminação por rejeito de mineração, outros estressores, como variação de temperatura e presença de predadores, buscando compreender melhor como os girinos reagiriam em uma escala mais próxima a realidade.
- iv. Realizar estudos em modelos ecossistêmicos, para compreender melhor como os efeitos observados podem afetar a população ou a comunidade ecossistêmica em uma escala mais próxima à realidade.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes**. 14p., 2004
- ADAMS, W. J. Aquatic Toxicology Testing Methods. In HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton, Lewis Publishers. Cap. 13, o. 25-46, 1995.
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 30, n. 1, p. 133–165, 1999.
- ARAÚJO, C. V. M. et al. Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 70–75, 1 jan. 2014a.
- ARAÚJO, C. V. M. et al. Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as a habitat disturber. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 5, p. 851–860, 1 jul. 2014b.
- BAIRD, C. 2002. Química Ambiental. Trad. A.M.L.Receio e L.C.M. Carrera, 2ª ed. Porto Alegre: Bookman.
- BARBA, M. D. "Mesmo sem ser tóxica, lama de barragem em Mariana deve prejudicar ecossistema por anos", 2015. Disponível em:<http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/11/151107_barragem_mariana_mdb_fd>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2018.
- BAUDO, R. Ecotoxicological testing with Daphnia. **Instituto Italiano de Idrobiologia**, v. 45, p. 461-482, 1987.
- BECKER, C. G. et al. Habitat Split and the Global Decline of Amphibians. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1775–1777, 14 dez. 2007.
- BENGTSSON, B.-E. 1974. Effect of zinc on the movement pattern of the minnow. *Phoxinus phoxinus* L. **Water Research**. v.8, n.10, p. 829-833.
- BIRDSALL, C. W.; GRUE, C. E.; ANDERSON, A. Lead concentrations in bullfrog *Rana catesbeiana* and green frog *R. clamitans* tadpoles inhabiting highway drainages. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 40, n. 3, p. 233–247, 1 jan. 1986.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v. 5, n. 4, p. 597–608, 1 jul. 2002.

BRASIL, Setor mineral representa 4% do PIB brasileiro, 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2014/12/setor-mineral-representa-4-por-cento-do-pib-brasileiro>> Acesso em 18 de fevereiro de 2018.

CAREY, C. Hypothesis Concerning the Causes of the Disappearance of Boreal Toads from the Mountains of Colorado. **Conservation Biology**, v. 7, n. 2, p. 355–362, 1 jun. 1993.

CARVALHO, M. S. DE et al. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 37–41, 26 set. 2017.

COOPER, G. P.; MANALIS, R. S. Cadmium: Effects on transmitter release at the frog neuromuscular junction. **European Journal of Pharmacology**, v. 99, n. 4, p. 251–256, 6 abr. 1984.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CPRM, Relatório perspectivas do meio ambiente no Brasil: GEO-BRASIL, 2002. Brasília, março 2002. 31 p.

CUVIN-ARALAR, M.L. Survival and heavy metal accumulation of two *Oreochromis niloticus* (L.) strains exposed to mixtures of zinc, cadmium and mercury. **Science Total Environment.**, v.148, n.1, p.31-38, 1994.

DEGARADY, C. J.; HALBROOK, R. S. Using Anurans as Bioindicators of PCB Contaminated Streams. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 1, p. 127–130, 1 mar. 2006.

ELLGAARD, E.G., TUSA, J.E, MALIZIA, A.A. Jr. 1978. Locomotor activity of the bluegill *Lepomis macrochirus*: hyperactivity induced by sublethal concentrations of cadmium, chromium and zinc. **Journal of Fish Biology**. v. 12, n. 1, p. 19-23.

FERNANDES, F. R. C.; ALAMINO, R. C. J.; ARAÚJO, E. R., 2014, Recursos Minerais e Comunidades: impactos humanos; socioambientais e econômicos (Rio de Janeiro), CETEM/MCTI.

FERREIRA, C. M. et al. Effects of Copper Oxychloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 3, p. 465–470, 1 set. 2004.

- FERREIRA, C. M. Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas. 2002, 117 f. Teses (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- FREEMAN, R.A., EVERHART, W.H., 1971. Toxicity of aluminum hydroxide complexes in neutral and basic media to rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**. 100: 644-658.
- FREITAS, C. M. DE; SILVA, M. A. DA; MENEZES, F. C. DE. O desastre na barragem de mineração da Samarco: fratura exposta dos limites do Brasil na redução de risco de desastres. *Ciência e Cultura*, v. 68, n. 3, p. 25–30, set. 2016.
- FRYDAY, S.; THOMPSON, H. Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. **EFSA Supporting Publications**, v. 9, n. 9, p. n/a-n/a, 1 set. 2012.
- FUNGARO, D. A., IZIDORO J. C, Remediação de drenagem ácida de mina usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de Quim. Nova, Vol. 29, No. 4, 735-740, 2006
- GALVÃO, L. A. C. & COREY, G., 1987. Mercurio. Serie Vigilancia 7, Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS
- GARCIA-MUÑOS, E., GUERREIRO, F., PARRA, G.; Effects of Copper Sulfate on Growth, Development, and Escape Behavior in *Epidalea calamita* Embryos and Larvae. 2009, **Archives for Environmental Contamination and Toxicology** 56:557-565
- GARDNER, T. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 2, p. 25–44, 2001.
- GARNIER, J. et al. Solid speciation and availability of chromium in ultramafic soils from Niquelândia, Brazil. **Journal of Geochemical Exploration**, Extended Abstracts presented at the 7th Symp. on the Geochemistry of the Earth's Surface (GES-7). v. 88, n. 1, p. 206–209, 1 jan. 2006.
- GOSNER, K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on 750 identification. *Herpetologica* 16: 183–190.

GROSS, J. A.; CHEN, T.-H.; KARASOV, W. H. Lethal and sublethal effects of chronic cadmium exposure on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1192–1197, 1 jun. 2007.

GUILHERME, L.R.G. et al. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, Easton, v.11, n.7, p.714-719. 1977.

HAMMOND, J. I. et al. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 6, p. 593–606, 1 set. 2012.

HERMAN, T.B.; SCOTT, F.W.: 1992, 'Assessing the vulnerability of amphibians to climatic warming', In: Bishop, C.A., and Pettit, K.E. (eds.), *Declines in Canadian amphibian populations: designing a national monitoring strategy*, Occ. Pap. Canadian Wildl. Serv. **76**, 46–49.

HEYER, W. R. et al. Decimations, Extinctions, and Colonizations of Frog Populations in Southeast Brazil and Their Evolutionary Implications. **Biotropica**, v. 20, n. 3, p. 230–235, 1988.

HUTCHINSON, G.E. 1957 A Treatise on Limnology: Geography Physics and Chemistry. v.1, New York: John Wiley & Sons. 1.015p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Laudo Técnico Preliminar - Impactos Ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Brasília, 2015.

JAMES, S. M.; LITTLE, E. E. The effects of chronic cadmium exposure on American toad (*Bufo americanus*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 377–380, 1 fev. 2003.

JUNG, R. E.; JAGOE, C. H. Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green tree frog (*Hyla cinerea*) tadpoles. **Canadian Journal of Zoology**, v. 73, n. 12, p. 2171–2183, dez. 1995.

KARAN, V. et al. Functional Enzymes Activity and Gill Histology of Carp after Copper Sulfate Exposure and Recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, n. 1, p. 49–55, 1 maio 1998.

KHAYRULLIN, A. et al. Chronic alcohol exposure induces muscle atrophy (myopathy) in zebrafish and alters the expression of microRNAs targeting the Notch pathway in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 3, p. 590–595, 21 out. 2016.

KRISHNAMURTHY, S.V.; HUSSAIN, S. A., Distribution of amphibian species in Kudremukh National Park (Western Ghats India) in relation to mining and related habitat changes, *Herp. Jr.* 14, 2004, 129-135.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182–186, 1 fev. 2003.

LANNOO, M.J. 2008. Malformed frogs: the collapse of aquatic ecosystems. Berkeley and Los Angeles, California and London, England: University of California Press.

LEBBORONI, M. et al. Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, n. 1, p. 73–79, 1 mar. 2006.

LEHNER, P. N., Handbook of ethological methods. Second Edition. New York: Garland STPM Press, 1996.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A Criação de Rãs**, 2ªed., São Paulo: Globo, 187p., 1989.

MARCANTONIO, A. S. [UNESP. Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos. **Aleph**, p. 92 f. : il., 17 ago. 2015.

MARIANA (Município). Plano Municipal de Saneamento Básico de Mariana. Mariana, MG, 2014. Disponível em: <http://giaia.eco.br/wpcontent/uploads/2015/11/produto-8-relatorio-final-do-pmsb-de-mariana.pdf>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

MARIN, G. B., FROMENT, G. F., LEROU, J. J., Simulation of a catalytic naphtha reforming unit. Proceedings of the 3rd International Congress on Computers and Chemical Engineering. 1983, E.F.C.E. Publication Series 27(II), C117-1-7, Paris.

- MASSARIN, S. et al. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 309–319, 1 set. 2010.
- MCGEER, J. C. et al. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 231–243, 1 set. 2000.
- MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 209–220, 2010.
- METEYER, C.U. 2000. Field guide to malformations of frogs and toads with radiographic interpretations. Biological Science Report USGS/BRD/BSR–2000–0005.
- MINERAL (CETEM), C. DE T.; BARRETO, M. L. (ED). **Mineração e desenvolvimento sustentável: desafios para o Brasil**. [s.l.] Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), 2001.
- MIRANDA, A. D. O.; Potencial de Aprovechamiento de Lodos Generados en el Proceso de Potabilización de Agua para Consumo Humano; Universidad de San Carlos de Guatemala; Guatemala 2017.
- MORGAN, E.L. YOUNG, R.C., 1984. Automated fish respiratory monitoring system for stream acidification episode assessment. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen. 22: 1432-1435.
- MURTY, A. S., 1988. Toxicity of pesticide to fish. Department of Zoology, University Nagarjunasgar. Nagarjuna, Inadia 1 (3): 178. In: HOOFFMAN, D. J. et al. Handbook of ecotoxicology. Boca Raton, Lewis Publishers. 1995, Cap 13, p 25-46.
- OGILVIE, D.M. & D.M. STECHEY. 1983. Effects of aluminum on respiratory responses and spontaneous activity of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 2; 43-48.
- OLIVEIRA, N. "Desastre em Mariana é o maior acidente mundial com barragens em 100 anos", 2016. Disponível em:<<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-01/desastre-em-mariana-e-o-maior-acidente-mundial-com-barragens-em-100-anos>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2018.
- OSSANA, N. A. et al. Toxicity of Waterborne Copper in Premertamorphic Tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 712-715, 2010.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications**. [s.l.] Hemisphere Publishing, New York, NY, 1 jan. 1985. Disponível em: <<https://www.osti.gov/biblio/5014403>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

REIS, P.F.; MORO, A.R.P.; MERINO, E. A. D. Prevenção do risco de quedas na terceira idade: Uma abordagem no ambiente construído. In: 11º ERGODESIGN – UNIHC, 2011, Manaus: UFAM, 2011, v.1.

RODRIGUES, L. "Justiça suspende obrigação de Samarco, Vale e BHP depositarem R\$1,2 bi", 2017. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-01/justica-suspende-obrigacao-de-samarco-vale-e-bhp-depositarem-r-12-bi>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

SAKUMA, M., Probit analysis of preference data, 1998, **Applied Entomology and Zoology** 33:339–347.

SALA, O.E., CHAPIN, I.F.S., ARMESTO, J.J., BERLOW, E., BLOONFIELD, J., JACKSON, R.B., KINZING, A., LEEMANS, R., LODGE, D.H., MOONEY, , WALKER, M., WALL, D.H., 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science** 287 (5459), 1770–1774

SAMARCO. Estudo de Impacto Ambiental Barragem de Rejeito do Fundão. Mariana – MG, 2005. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/siam/lc/2013/0001519840952013/7086862013.pdf>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2018.

SAMARCO. Relatório de Avaliação do Desempenho Ambiental Barragem do Fundão. Mariana, MG, 2013. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/siam/lc/2013/0001519840952013/7086862013.pdf>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2018.

SANTOS, V. S. dos. "Acidente em Mariana (MG) e seus impactos ambientais", 2017. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/acidente-mariana-mg-seus-impactos-ambientais.htm>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2018.

SANTOS, V. S. dos. "Impactos ambientais do acidente em Mariana (MG)"; Brasil Escola. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/impactos-ambientais-acidente-mariana-mg.htm>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2018.

SCHOFIELD, C.L., TROJNAR, J.R., 1980. Aluminum toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in acidified waters. pp. 341-362. In: T. Toribara, M. Miller & P. Morrow (ed.) *Polluted Rain*, Plenum Press, New York.

SHIRER, H.W., J. CAIRNS, Jr., W.T. WAILER. 196X. A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. **Water Resources Bull.** 4: 27-43.

SHUHAIMI-OTHMAN, M. et al. Toxicity of metals to tadpoles of the common Sunda toad, *Duttaphrynus melanostictus*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 364–376, 1 fev. 2012.

SILVA, A. C. DA; VIDAL, M.; PEREIRA, M. G. Impactos ambientais causados pela mineração e beneficiamento de caulim. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 54, n. 2, p. 133–136, jun. 2001.

SOKAL, R.; ROHLF, F.J. *Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research*, 1995, New York.

SOUZA, L. A. DE; SOBREIRA, F. G.; FILHO, J. F. DO P. CARTOGRAFIA E DIAGNÓSTICO GEOAMBIENTAL APLICADOS AO ORDENAMENTO TERRITORIAL DO MUNICÍPIO DE MARIANA – MG. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 3, n. 57, 2005.

SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.; KREST, S. 2010. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC/Taylor & Francis, Boca Raton.

SPIELMAN, A., SULLIVAN, J.J., Predation on peridomestic mosquitoes by hylid tadpoles on Grand Bahama Island. 1974. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 23: 704-709.

STORER, T.I.; USINGER, R.L. **Zoologia Geral**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1979. 757p.

TALAMONI, J.L.B.; OKANO, W.Y. 1997 Limnological characterization and plankton community structure in aquatic systems of different trophic state. **Verh International Verein Limnology**, Stuttgart, 26: 629-636.

TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M. C. de; FAIRCHILD, T. R.; TAIOLI, F. (Orgs.). *Decifrando a Terra*. São Paulo: Oficina de Textos, 2000. 557 p

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

VALE, J. H. do. "Samarco atrasa pagamento de aluguéis de vítimas de tragédia de Mariana", 2017. Disponível em: <http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2017/03/22/interna_gerais,856402/samarco-atrasa-pagamento-de-alugueis-de-moradores-vitimas-de-tragedia.shtml>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2018.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 25 abr. 2014.

VERONEZ, A. C. DA S. et al. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 101–108, 1 maio 2016.

APÊNDICE A – Dados obtidos na exposição aguda

Concentração	Réplica	Distância (cm)	Velocidade (m/s)
Controle	1	197,84	0,26
	2	71,79	0,36
	3	89,22	0,46
	4	82,24	0,29
	5	46,15	0,23
	6	63,68	0,47
	7	60,83	0,35
	8	77,66	0,47
	9	96,55	0,39
10%	1	135,29	0,46
	2	151,78	0,18
	3	67,81	0,31
	4	54,44	0,21
	5	79,84	0,37
	6	48,89	0,20
	7	118,21	0,24
	8	68,18	0,14
	9	178,34	0,33
25%	1	69,70	0,25
	2	141,57	0,29
	3	142,88	0,30
	4	55,14	0,30
	5	71,40	0,30
	6	67,58	0,15
	7	62,38	0,30
	8	97,74	0,21
	9	184,06	0,36
50%	1	89,97	0,32
	2	23,67	0,24
	3	56,12	0,22
	4	59,25	0,24
	5	76,48	0,22
	6	40,69	0,23
	7	59,39	0,27
	8	52,11	0,27
	9	133,78	0,26
75%	1	85,86	0,22
	2	82,44	0,34
	3	93,79	0,22
	4	37,63	0,22
	5	71,16	0,22
	6	102,48	0,28
	7	78,46	0,25
	8	72,94	0,30
	9	122,48	0,26
100%	1	54,08	0,29
	2	51,23	0,11
	3	119,22	0,26
	4	99,01	0,13
	5	85,61	0,17
	6	96,27	0,26
	7	100,66	0,22
	8	130,55	0,20
	9	60,87	0,23

APÊNDICE B – Tabela de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para a distância percorrida pelos girinos expostos no teste agudo

	Cont	10%	25%	50%	75%	100%
Cont	-	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
10%	1,000000	-	1,000000	0,303297	1,000000	1,000000
25%	1,000000	1,000000	-	0,268855	1,000000	1,000000
50%	1,000000	0,303297	0,268855	-	0,430696	0,355169
75%	1,000000	1,000000	1,000000	0,430696	-	1,000000
100%	1,000000	1,000000	1,000000	0,355169	1,000000	-

APÊNDICE C – Parâmetros físicos e químicos da exposição aguda

Tratamento		pH	OD (mg/L)	Cond ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	TDS (mg/L)	Turbidez (UNT)
Cont	Inicial	6,53	7,29	26,5	13	0
	Final	7,18	7,14	28,9	13	0
10%	Inicial	6,40	6,83	32,5	15	640
	Final	7,23	7,05	34,1	16	68
25%	Inicial	6,54	6,88	36,2	18	840
	Final	7,29	7,07	39,6	19	60
50%	Inicial	6,62	6,93	46,8	22	1640
	Final	7,35	7,04	53,9	25	182
75%	Inicial	6,78	6,93	59,7	27	2450
	Final	7,39	6,94	63,9	30	251
100%	Inicial	6,92	6,89	68,5	32	3240
	Final	7,48	6,91	81,3	38	466

APÊNDICE D – Calibração com NaCl do sistema de evitamento (avoidance)

Compartimento	Inicial		Final Sistema 1		Final Sistema 2	
	Conc. (mg/L)	Conduct. ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	Conc. (mg/L)	Conduct. ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	Conc. (mg/L)	Conduct. ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
1	0	28,0	4,8	38,5	3,8	36,4
2	17	63,8	14,0	58,2	14,3	58,9
3	33	98,8	32,6	97,8	34,0	100,8
4	50	137,6	45,7	125,7	48,7	132,3
5	66	169,0	65,6	168,2	65,8	168,6
6	83	204,0	81,9	203,0	81,0	201,0

APÊNDICE E – Calibração sem contaminação do sistema de evitamento
(avoidance)

Sistema 1				
Compartimentos	N. Observado	N. Esperado	N. Evasores	% Evitamento
0	4	4	0	0
1	2	4	2	50,0
2	1	3	2	66,6
3	2	3	1	33,3
4	1	2	1	50,0
5	2	2	0	0

Sistema 2				
Compartimentos	N. Observado	N. Esperado	N. Evasores	% Evitamento
0	3	3	0	0,0
1	2	3	1	33,3
2	2	3	1	33,3
3	2	3	1	33,3
4	1	2	1	50,0
5	2	2	0	0,0

APÊNDICE F – Parâmetros dos sistemas de evitamento (avoidance)

Avoidance - Sistema 1						
		pH	OD (mg/L)	Cond(µS/cm²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,08	7,37	27,0	13	0
	Final	7,25	6,86	40,3	18	28
10%	Inicial	6,55	7,35	30,6	14	350
	Final	7,35	7,03	46,4	22	176
25%	Inicial	6,79	7,37	36,9	17	900
	Final	7,39	6,94	50,6	23	222
50%	Inicial	6,95	7,34	49,4	24	3200
	Final	7,44	6,91	57,6	27	310
75%	Inicial	6,96	7,31	51,3	24	3000
	Final	7,45	6,87	65,3	31	560
100%	Inicial	7,50	7,41	72,6	34	4000
	Final	7,45	6,75	69,3	33	640

Avoidance - Sistema 2						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μ S/cm ²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,08	7,37	27,0	13	0
	Final	7,11	6,91	49,8	24	153
10%	Inicial	6,55	7,35	30,6	14	350
	Final	7,22	6,86	50,6	27	348
25%	Inicial	6,79	7,37	36,9	17	900
	Final	7,32	6,87	57,3	27	520
50%	Inicial	6,95	7,34	49,4	24	3200
	Final	7,37	6,75	65,2	31	620
75%	Inicial	6,96	7,31	51,3	24	3000
	Final	7,37	6,79	67,7	32	770
100%	Inicial	7,50	7,41	72,6	34	4000
	Final	7,39	6,83	68,2	32	930

Avoidance - Sistema 3						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μ S/cm ²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,28	7,39	27,2	13	0
	Final	7,05	7,42	47,5	22	63
10%	Inicial	6,65	7,39	28,9	14	283
	Final	7,15	7,48	50,0	24	132
25%	Inicial	6,78	7,38	33,6	16	800
	Final	7,20	7,51	56,0	26	308
50%	Inicial	6,94	7,48	44,6	21	1860
	Final	7,23	7,36	56,3	26	390
75%	Inicial	6,86	7,48	43,8	24	2330
	Final	7,27	7,65	58,2	27	461
100%	Inicial	7,42	7,46	66,4	31	4500
	Final	7,26	7,37	57,3	29	1000

Avoidance - Sistema 4						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μ S/cm ²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,28	7,39	27,2	13	0
	Final	7,03	7,40	39,0	12	37
10%	Inicial	6,65	7,39	28,9	14	283
	Final	7,20	7,27	46,0	22	120
25%	Inicial	6,78	7,38	33,6	16	800
	Final	7,30	7,70	49,8	24	350
50%	Inicial	6,94	7,48	44,6	21	1860
	Final	6,31	7,67	55,4	26	400
75%	Inicial	6,86	7,48	43,8	24	2330
	Final	7,30	7,24	66,4	31	430
100%	Inicial	7,42	7,46	66,4	31	4500
	Final	7,30	7,59	63,2	30	1070

APÊNDICE G – Dados obtidos na exposição crônica 1 (16 dias)

Tratamento	Réplica	Animal	Dist (cm)	Vel.(m/s)	Peso (g)	Comp. (mm)	Estágio	
Controle	1	1	209,56	0,30	0,210	11,1	27	
	1	2	186,48	0,37	0,293	12,1	28	
	1	3	171,93	0,20	0,257	11,2	27	
	1	4	144,27	0,38	0,179	10,3	27	
	1	5	198,29	0,58	0,237	10,3	28	
	1	6	241,57	0,49	0,224	10,5	27	
	2	1	77,00	0,33	0,105	8,4	25	
	2	2	109,4	0,26	0,211	10,0	27	
	2	3	218,25	0,43	0,244	11,3	27	
	2	4	165,37	0,25	0,141	9,5	26	
	2	5	198,62	0,42	0,263	11,1	28	
	2	6	174,80	0,44	0,277	11,2	27	
	3	1	100,09	0,29	0,147	9,7	27	
	3	2	204,14	0,39	0,200	10,0	26	
	3	3	150,49	0,37	0,199	10,1	26	
	3	4	150,24	0,31	0,212	10,0	27	
	3	5	127,03	0,45	0,196	10,7	26	
	4	1	118,42	0,28	0,223	10,5	27	
	4	2	128,66	0,35	0,180	10,4	28	
	4	3	147,12	0,44	0,227	10,8	26	
	4	4	140,63	0,47	0,157	9,5	26	
	4	5	58,27	0,47	0,373	13,3	28	
	4	6	177,14	0,35	0,273	11,4	28	
	25%	1	1	117,10	0,25	0,132	8,6	25
		1	2	75,38	0,31	0,170	9,4	25
		1	3	65,61	0,22	0,196	10,0	26
		1	4	107,41	0,32	0,283	10,7	26
		1	5	101,42	0,27	0,152	9,2	26
		1	6	118,85	0,31	0,307	11,2	26
		2	1	70,99	0,21	0,186	10,0	26
		2	2	66,17	0,24	0,185	10,1	25
		2	3	63,58	0,38	0,245	10,0	26
2		4	64,72	0,39	0,240	10,7	26	
2		5	68,21	0,28	0,199	10,2	26	
3		1	86,29	0,31	0,233	10,5	26	
3		2	43,37	0,32	0,213	10,1	26	
3		3	69,31	0,39	0,320	12,0	26	
3		4	98,94	0,42	0,291	11,3	27	
3		5	58,17	0,21	0,193	10,0	26	
3		6	51,39	0,26	0,171	9,2	27	
4		1	84,51	0,23	0,206	10,4	27	
4		2	78,95	0,35	0,295	11,4	25	
4		3	75,60	0,29	0,261	10,5	25	
4		4	47,53	0,32	0,267	11,2	26	
4		5	92,21	0,42	0,282	11,0	26	
50%		1	1	59,88	0,26	0,150	8,7	27
		1	2	71,20	0,30	0,218	10,3	26
		1	3	117,92	0,34	0,212	9,7	26
		1	4	76,44	0,37	0,256	10,7	25
		1	5	109,47	0,33	0,207	9,5	26
		1	6	70,38	0,39	0,284	10,4	27
	2	1	87,87	0,35	0,188	9,3	27	
	2	2	45,09	0,29	0,213	10,4	26	
	2	3	60,48	0,26	0,219	10,5	26	
	2	4	73,34	0,28	0,252	10,7	26	
	2	5	34,09	0,25	0,291	10,5	26	
	2	6	41,57	0,29	0,180	9,6	25	
	3	1	66,49	0,32	0,179	10,1	28	
	3	2	80,40	0,30	0,257	10,4	27	
	3	3	118,14	0,28	0,351	11,5	25	
	3	4	85,34	0,30	0,212	9,5	27	
	3	5	95,82	0,35	0,203	9,5	26	
	3	6	88,49	0,27	0,147	9,0	26	
	4	1	121,18	0,36	0,409	13,0	27	
	4	2	71,83	0,21	0,130	9,0	26	
	4	3	122,17	0,40	0,288	11,1	27	
	4	4	53,31	0,26	0,216	9,0	25	
	4	5	63,08	0,18	0,178	9,3	27	
	4	6	68,02	0,21	0,125	9,0	26	
	100%	1	1	115,77	0,28	0,223	10,3	27
		1	2	111,56	0,40	0,420	13,0	27
		1	3	61,41	0,21	0,312	11,5	26
		1	4	99,96	0,32	0,236	10,0	26
1		5	49,47	0,23	0,206	9,4	26	
1		6	132,20	0,32	0,403	13,0	26	
2		1	110,36	0,23	0,148	8,5	25	
2		2	52,60	0,16	0,181	9,4	27	
2		3	68,29	0,20	0,160	9,6	27	
2		4	77,29	0,31	0,185	9,3	27	
2		5	82,35	0,26	0,240	10,3	27	
3		1	84,40	0,23	0,257	11,0	27	
3		2	54,53	0,23	0,294	11,2	26	
3		3	99,28	0,33	0,229	10,6	26	
3		4	104,44	0,29	0,321	12,2	27	
3		5	-	-	0,309	10,5	25	
3		6	65,47	0,19	0,246	10,4	26	
4		1	82,84	0,22	0,299	11,1	26	
4		2	85,54	0,34	0,459	12,4	26	
4		3	90,55	0,22	0,186	9,6	26	
4		4	64,83	0,23	0,165	9,7	27	
4		5	79,10	0,25	0,328	11,6	26	

APÊNDICE H – Peso inicial de girinos ao início da exposição crônica 1 (16 dias)

Girino	Peso (g)
1	0,282
2	0,270
3	0,340
4	0,155
5	0,280
6	0,312
7	0,220
8	0,179
9	0,182
10	0,511
11	0,214
12	0,199

APÊNDICE I – Tabela de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para o peso dos girinos da exposição crônica 1 (16 dias)

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	1,000000	1,000000	0,326883
25%	1,000000	-	1,000000	1,000000
50%	1,000000	1,000000	-	0,570793
100%	0,326883	1,000000	0,570793	-

APÊNDICE J – Tabela de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para o comprimento dos girinos da exposição crônica 1 (16 dias)

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	1,000000	0,131815	1,000000
25%	1,000000	-	0,592197	1,000000
50%	0,131815	0,592197	-	0,255823
100%	1,000000	1,000000	0,255823	-

APÊNDICE K – Parâmetros físicos e químicos da exposição crônica 1 (16 dias)

Exposição Crônica 1 - Troca 1						
		pH	OD (mg/L)	Cond ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	TDS (mg/L)	Turbidez (UNT)
Cont	Inicial	6,52	7,36	29,1	14	0
	Final	7,22	7,02	44,0	21	2
25%	Inicial	6,58	7,26	39,1	18	930
	Final	7,20	7,05	44,4	25	68
50%	Inicial	6,66	7,27	50,9	24	1480
	Final	7,32	7,12	64,3	29	85
100%	Inicial	6,98	7,28	71,7	34	3360
	Final	7,36	6,66	95,3	45	40

Exposição Crônica 1 - Troca 2						
		pH	OD (mg/L)	Cond ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	TDS (mg/L)	Turbidez (UNT)
Cont	Inicial	6,55	7,82	26,9	12	0
	Final	7,29	7,84	39,8	18	2
25%	Inicial	6,65	7,75	37,9	18	530
	Final	7,45	7,86	44,0	21	35
50%	Inicial	6,68	7,80	50,6	24	1000
	Final	7,53	7,86	63,2	29	42
100%	Inicial	7,05	7,80	67,2	31	2300
	Final	7,44	7,26	95,3	45	24

Exposição Crônica 1 - Troca 3						
		pH	OD (mg/L)	Cond ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	TDS (mg/L)	Turbidez (UNT)
Cont	Inicial	6,61	7,43	26,9	12	0
	Final	7,45	7,82	30,8	14	3
25%	Inicial	6,71	7,36	37,6	18	650
	Final	7,45	7,80	43,7	21	38
50%	Inicial	6,89	7,41	49,8	24	910
	Final	7,51	7,66	62,4	30	65
100%	Inicial	7,11	7,42	63,2	29	1510
	Final	7,59	7,68	94,7	45	80

Exposição Crônica 1 - Troca 4						
		pH	OD (mg/L)	Cond ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	TDS (mg/L)	Turbidez (UNT)
Cont	Inicial	6,55	7,53	29,2	13	0
	Final	7,11	7,46	32,5	14	2
25%	Inicial	6,64	7,56	38,1	18	930
	Final	7,40	7,55	47,0	22	31
50%	Inicial	6,92	7,58	48,6	23	1560
	Final	7,44	7,46	62,0	29	59
100%	Inicial	6,90	7,61	63,0	30	2830
	Final	7,49	7,17	94,3	44	87

APÊNDICE L – Dados obtidos na exposição crônica 2 (20 dias)

Conc	Réplica	Vel max (m/s)	Dist (cm)	Peso (g)	Comp (mm)	Estágio
Cont	1	0,47	306,1	1,379	20,3	29
Cont	2	0,24	40,31	1,294	19,2	28
Cont	3	0,53	156,8	1,67	22,5	29
Cont	4	0,23	100,86	1,397	20,2	29
Cont	5	0,51	266,25	2,126	22,5	31
Cont	6	0,24	367,52	1,665	21	29
Cont	7	0,42	265,84	2,886	24	32
Cont	8	0,44	459,36	2,002	22,6	32
Cont	9	0,5	208,57	3,008	24,2	31
Cont	10	0,57	232,82	3,368	27	31
Cont	11	0,23	268,46	3,817	27,1	33
Cont	12	0,67	184,01	1,854	20,7	30
Cont	13	0,34	136,91	1,626	20,1	29
Cont	14	0,48	196,96	2,327	21,3	30
Cont	15	0,55	440,08	1,738	21,3	29
Cont	16	-	-	-	-	30
Cont	17	-	-	3,768	26,4	31
Cont	18	-	-	3,852	27,2	31
Cont	19	-	-	3,921	28,1	31
Cont	20	-	-	3,346	26,6	30
C1	1	0,48	263,93	1,937	21,7	28
C1	2	0,44	187,07	1,491	19,6	31
C1	3	0,2	121,02	1,824	22	29
C1	4	0,28	114,05	2,005	22,4	29
C1	5	0,54	233,53	3,063	25,5	31
C1	6	0,45	279,9	4,142	27,7	31
C1	7	0,49	231,26	1,653	21	29
C1	8	0,49	243,62	2,245	22,1	31
C1	9	0,48	173,45	2,387	23,4	29
C1	10	0,49	153,46	1,355	20,1	28
C1	11	0,37	182,36	2,596	24,3	28
C1	12	0,52	227,56	2,811	26	31
C1	13	0,58	165,82	1,74	22	31
C1	14	0,51	174,31	2,083	22,3	29
C1	15	0,43	150,76	1,306	19,2	29
C1	16	-	-	4,028	27,3	30
C1	17	-	-	3,812	28,3	31
C1	18	-	-	2,776	25,4	29
C1	19	-	-	2,503	27,4	28
C1	20	-	-	4,286	28,5	31
C2	1	0,49	460,82	1,569	21	28
C2	2	0,44	162,1	2,399	23,3	31
C2	3	0,51	244,67	1,82	23,2	30
C2	4	0,4	262,46	1,668	22	30
C2	5	0,54	217,66	1,512	20	29
C2	6	0,3	302,23	3,172	25,8	32
C2	7	0,48	198,46	1,657	21	28
C2	8	0,42	188,88	2,598	25,1	30
C2	9	0,38	124,55	1,965	22	31
C2	10	0,47	297,79	2,041	22,1	31
C2	11	0,42	331,18	2,076	22,5	31
C2	12	0,28	264,95	3,532	27,3	31
C2	13	0,35	179,29	3,7	27,7	33
C2	14	0,24	170,35	1,41	19,6	28
C2	15	0,34	116,21	2,036	22,7	31
C2	16	-	-	2,044	23,7	28
C2	17	-	-	4,115	28,5	31
C2	18	-	-	3,16	28,2	30
C2	19	-	-	3,895	27,5	31
C2	20	-	-	3,696	27,9	30
C3	1	0,44	359,07	3,614	28	31
C3	2	0,3	208,3	1,515	21	29
C3	3	0,27	235,66	2,115	23,1	31
C3	4	0,39	109,45	2,156	23	31
C3	5	0,26	333,18	1,838	22	29
C3	6	0,42	131,14	2,272	23,2	32
C3	7	0,4	232,07	3,298	27,1	32
C3	8	0,29	206,59	1,869	22,6	28
C3	9	0,33	119,29	4,223	28,4	31
C3	10	0,55	188,48	4,716	28,5	33
C3	11	0,47	207,01	1,703	21	29
C3	12	0,25	96,74	1,926	21,7	30
C3	13	0,38	283,65	2,359	24,2	31
C3	14	0,29	252,88	2,53	28,5	29
C3	15	0,31	254,44	1,715	27,6	28
C4	16	-	-	2,854	24,6	28
C5	17	-	-	5,254	30,5	31
C6	18	-	-	2,025	21,5	28
C7	19	-	-	2,48	22,7	29
C8	20	-	-	4,492	27,1	31

APÊNDICE M – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para distância percorrida pelos girinos da exposição crônica 2 (20 dias)

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	0,777337	1,000000	1,000000
25%	0,777337	-	1,000000	1,000000
50%	1,000000	1,000000	-	1,000000
100%	1,000000	1,000000	1,000000	-

APÊNDICE N – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Tukey para velocidade máxima de natação dos girinos da exposição crônica 2 (20 dias)

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	0,941681	0,926000	0,267386
25%	0,941681	-	0,639201	0,088235
50%	0,926000	0,639201	-	0,617795
100%	0,267386	0,088235	0,617795	-

APÊNDICE O – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para comprimento dos girinos da exposição crônica 2 (20 dias)

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	1,000000	1,000000	0,405790
25%	1,000000	-	1,000000	1,000000
50%	1,000000	1,000000	-	1,000000
100%	0,405790	1,000000	1,000000	-

APÊNDICE P – Tabelas de multicomparação dos valores de p do teste de Kruskal-Wallis para peso dos girinos da exposição crônica 2 (20 dias)

	Controle	25%	50%	100%
Controle	-	1,000000	1,000000	1,000000
25%	1,000000	-	1,000000	1,000000
50%	1,000000	1,000000	-	1,000000
100%	1,000000	1,000000	1,000000	-

APÊNDICE Q – Dados da respirometria obtidos após a exposição crônica 2 (20 dias)

	Taxa de consumo de Oxigênio (mgO₂/animal*h)	Peso (g)	Taxa de consumo de oxigênio (mgO₂/g*h)
Cont 1	22,9233	1,379	16,623
Cont 2	21,4772	1,294	16,597
Cont 3	22,4977	1,670	13,472
Cont 4	22,3347	1,397	15,988
25% 1	22,4154	1,937	11,572
25% 2	22,9614	1,491	15,400
25% 3	22,2509	1,824	12,199
25% 4	21,2782	2,005	10,613
50% 1	19,9255	1,569	12,699
50% 2	22,3512	2,399	9,317
50% 3	20,1331	1,820	11,062
50% 4	22,5487	1,668	13,518
100% 1	21,1008	3,614	5,839
100% 2	22,0642	1,515	14,564
100% 3	21,8275	2,115	10,320
100% 4	21,5273	2,156	9,985

APÊNDICE R – Parâmetros físicos e químicos da exposição crônica 2 (20 dias)

Exposição Crônica 2 - Troca 1						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μ S/cm ²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,3	7,54	26,7	13	0
	Final	7,11	6,58	29,7	14	3
25%	Inicial	6,61	7,52	37,2	18	1290
	Final	7,38	7,54	48,5	22	14
50%	Inicial	6,80	7,58	50,2	24	2160
	Final	7,48	7,58	61,0	29	51
100%	Inicial	6,92	7,64	60,2	28	3850
	Final	7,57	7,57	82,6	39	60

Exposição Crônica 2 - Troca 2						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μ S/cm ²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,75	7,99	27,2	12	0
	Final	7,30	7,53	31,0	14	3
25%	Inicial	6,87	7,67	42,7	19	1560
	Final	7,50	7,65	45,0	22	8
50%	Inicial	6,96	7,60	49,6	23	3700
	Final	7,56	7,77	60,7	29	9
100%	Inicial	7,15	7,68	65,4	31	4400
	Final	7,76	7,71	84,4	40	9

Exposição Crônica 2 - Troca 3						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μ S/cm ²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,55	7,58	28,4	13	0
	Final	7,26	7,46	30,5	14	4
25%	Inicial	6,69	7,61	38,6	18	1580
	Final	7,43	7,56	46,5	22	8
50%	Inicial	6,89	7,64	47,1	22	2894
	Final	7,5	7,52	61,6	30	8
100%	Inicial	7,0	7,62	61,0	28	4420
	Final	7,62	7,51	84,0	40	9

Exposição Crônica 2 - Troca 4						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μS/cm²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,48	7,47	26,9	13	0
	Final	7,05	7,32	29,9	14	3
25%	Inicial	6,68	7,41	38,2	18	1220
	Final	7,37	7,62	45,6	21	9
50%	Inicial	6,78	7,32	48,6	23	2800
	Final	7,42	7,60	59,5	28	8
100%	Inicial	6,95	7,42	58,9	28	3820
	Final	7,57	7,58	82,8	39	9

Exposição Crônica 2 - Troca 5						
		pH	OD (mg/L)	Cond(μS/cm²)	TDS(mg/L)	Turbidez(UNT)
Cont	Inicial	6,39	7,40	27,0	13	0
	Final	7,15	7,21	31,0	15	2
25%	Inicial	6,61	7,50	37,8	18	1530
	Final	7,42	7,62	45,4	21	5
50%	Inicial	6,81	7,51	48,0	23	2740
	Final	7,52	7,59	60,4	29	6
100%	Inicial	9,96	7,55	61,0	29	4340
	Final	7,62	6,96	84,8	40	8

ANEXO A – Estágios de desenvolvimento de girinos.

Elaborada por Gosner (1960), esta tabela foi utilizada para identificar os estágios de desenvolvimento no qual os girinos se encontravam após a exposição crônica de 16 dias.

