

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**"Efeitos do rompimento da barragem de Fundão sobre a assimetria flutuante de comunidades de girinos da
Bacia do Rio Doce"**

Carolina de Freitas Quirino

São João del-Rei

2024

Carolina de Freitas Quirino

**"Efeitos do rompimento da barragem de Fundão sobre a assimetria flutuante de comunidades de girinos da
Bacia do Rio Doce"**

Orientador: Rafael Félix de Magalhães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ecologia da Universidade Federal de São João del-Rei, como
requisito parcial à obtenção do título de mestre.

São João del-Rei

2024

Nome: Carolina de Freitas Quirino

Título: Efeitos do rompimento da barragem de Fundão sobre a assimetria flutuante de comunidades de girinos da
Bacia do Rio Doce

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ecologia da Universidade Federal de São João del-Rei, como
requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dra. Iola Gonçalves Boëchat (Membro interno titular)

Universidade Federal de São João del-Rei

Prof. Dra. Camila Palhares Teixeira

Universidade Estadual de Minas Gerais (Membro externo titular)

Prof. Dr. Cristiano Schetini de Azevedo (Membro interno suplente)

Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dra. Núbia Carla Santos Marques (Membro externo suplente)

Instituto Tecnológico Vale



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO JOÃO DEL-REI PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 5 / 2024 - PGE (13.08)

Nº do Protocolo: 23122.016844/2024-77

São João del-Rei-MG, 24 de junho de 2024.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI
/ UFSJATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

Aos vinte e três dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte e quatro, às 14 horas, na Universidade Federal de São João del - Rei, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado da aluna Carolina de Freitas Quirino. A banca examinadora foi composta pela professora Dra. Camila Palhares Teixeira, UEMG, examinadora externa, pela professora Dra. Iola Gonçalves Boechat, UFSJ, examinadora interna, e pelo professor Dr. Rafael Felix de Magalhães, UFSJ, orientador. Deu-se início a abertura dos trabalhos, por parte do professor Rafael Felix de Magalhães, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou a candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "**Efeitos do rompimento da barragem de Fundão sobre a assimetria flutuante de comunidades de girinos da Bacia do Rio Doce**", marcando um tempo de quarenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Rafael Felix de Magalhães, presidente, passou a palavra à examinadora externa, professora Camila Palhares Teixeira, para arguir a candidata, e, em seguida, à examinadora interna, professora Iola Gonçalves Boechat, examinadora interna para que fizesse mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a candidata foi APROVADA conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del - Rei. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa no prazo de 30(trinta) dias, a contar da data de defesa, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa, conforme o artigo 97 da Resolução CONEP Nº 001, de 15 de março de 2023. A candidata não terá o título se não cumprir as exigências acima descritas

(Assinado digitalmente em 25/06/2024 16:28)

IOLA GONCALVES BOECHAT PROFESSOR DO
MAGISTERIO SUPERIOR DE GEO (12.20)

Matrícula: 2566929

(Assinado digitalmente em 25/06/2024 09:42)

RAFAEL FELIX DE MAGALHAES
COORDENADOR
PGE (13.08)

Matrícula: 3154780

(Assinado digitalmente em 24/06/2024 20:13)

CAMILA PALHARES TEIXEIRA
ASSINANTE EXTERNO CPF:
040.108.966-55

(Assinado digitalmente em 28/06/2024 11:22)

CAROLINA DE FREITAS QUIRINO
DISCENTE

Matrícula: 2022101620

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp>

informando seu número: **5**, ano: **2024**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **24/06/2024** e o código de verificação: **3e3eefb5bf**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB) e
Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Quirino, Carolina de Freitas .

Q8e Efeitos do rompimento da barragem de Fundão sobre
a assimetria flutuante de comunidades de girinos da
Bacia do Rio Doce / Carolina de Freitas Quirino ;
orientador Rafael Félix de Magalhães; coorientador
Tiago Leite Pezzuti. -- São João del-Rei, 2024.

59 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ecologia) -- Universidade Federal de São João del
Rei, 2024.

1. Anura. 2. Contaminação ambiental. 3. Mineração.
4. Ecologia de comunidades. 5. pGLMM. I. de
Magalhães, Rafael Félix , orient. II. Pezzuti, Tiago
Leite, co-orient. III. Título.

Financiamentos:



Apoio e colaborações:



Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador Rafael Félix de Magalhães pela oportunidade de trabalho. A Daniela Fonseca dos Santos, por todo apoio, orientação e diversão que me proporcionou toda vez que nos encontramos para realização desse trabalho.

Quero agradecer minha mãe e minha irmã, Ana e Rafaela, pelo apoio e amor principalmente ao longo do mestrado, pelas horas revisando texto, procurando artigos e desabafando. Agradeço também minha segunda família de São João del-Rei, que me acolhe e apoia desde que os conheci.

Agradeço meu parceiro Pedro, por me apoiar e tornar todos os meus dias mais fáceis e divertidos, explorando caminhos novos, jogos e leituras, do nosso jeito. Sem você eu não teria chegado até aqui.

Quero agradecer também a minha psicóloga, Hedair por todo incentivo e apoio semanais que foram essenciais para que eu concluísse essa etapa. Se eu finalmente tenho uma contribuição científica, você faz parte dela. Gostaria de agradecer minha companheira de turma Géssica Nascimento, por tudo que passamos, em especial pela nossa amizade e sua presença em minha vida.

Agradeço a minha avó Maria do Carmo, como em uma carta de amor, há muito devida, por percorrer os campos antes de mim e fazer meu caminho suave o bastante para que eu chegasse aonde ela nunca poderia chegar.

Por fim, gostaria de agradecer a FAPEMIG pelo suporte financeiro, ao PGE pelo programa de pós-graduação em Ecologia e a UFSJ pela oportunidade de poder me especializar dentro de uma Universidade Federal, especialmente no mesmo lugar em que minha mãe se especializou.

“Contra essa retórica grandiosa, o jardim de Darwin oferece uma resposta: em algum momento o poder da ciência sofrerá um declínio e a natureza exigirá Down de volta.”

O jardim de Darwin – Michael Boulter

Sumário:

1- Introdução	12
1.1- Cenário do rompimento da barragem do Fundão	13
1.2- Anuros como organismos modelo para avaliação de impactos	15
1.3- A assimetria flutuante como ferramenta para avaliação dos impactos	17
2- Material e Métodos	20
3- Resultados	27
4- Discussão	31
5- Conclusão	36
6- Referências	44

Lista de figuras:

Figura 1: Mapa georreferenciado das áreas amostradas e suas respectivas lagoas que constaram a presença de girinos.

Figura 2: Representação esquemática de um girino em vista lateral que exemplifica como é feito o cálculo da distância entre dois pontos.

Figura 3: Desenho esquemático de um girino em vista dorsal e lateral.

Figura 4: Gráfico *boxplot* da variação na assimetria flutuante em cada tipo de área.

Figura 5: Representação gráfica da variação média do IAF de cada espécie por área e a relação filogenética entre as espécies amostradas.

Figura S1: *Screenplot* da PCA feita com os parâmetros ambientais coletados.

Figura S2: Ajuste dos resíduos do modelo.

Figura S3: Gráfico *boxplot* da altitude por tipo de área.

Figura S4: Gráfico *boxplot* do índice da turbidez por tipo de área. AA= Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas.

Figura S5: Gráfico *boxplot* da condutividade elétrica por cada tipo de área. AA= Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas.

Lista de tabelas:

Tabela 1: Descrição das medidas dos marcos anatômicos selecionados (AOF, AON, DNF e DO), aferidas para as análises de assimetria flutuante.

Tabela 2: Resultados da análise de um modelo misto linear generalizado filogenético (pGLMM).

Tabela S1: Dados dos pontos amostrais de cada área amostrada (AA, CA e AP).

Tabela S2: Vouchers do material utilizado de cada espécie e área para análises e N amostral.

Tabela S3: Dados ambientais, aferidos de cada ponto amostral, utilizados para criação da variável ambiental.

Tabela S4: Resultados das regressões entre os valores da diferença entre os lados direito e esquerdo aferidos pelos dois medidores.

Resumo

A atividade mineradora reduz significativamente a biodiversidade local e corpos d'água em seu entorno. Esses impactos são potencializados em casos de tragédias ambientais, como a ocasionada pelo rompimento da Barragem do Fundão. Os anfíbios são considerados bioindicadores ambientais e uma das formas pelos quais eles respondem aos estressores ambientais é através de instabilidades no desenvolvimento, avaliada pela assimetria flutuante (AF). Nosso objetivo foi examinar conjuntos de amostras coletadas em áreas afetadas pela lama da barragem do Fundão e compará-las com amostras de áreas não afetadas através de parâmetros da AF, visando avaliar a presença de efeitos persistentes do rejeito sobre distúrbios no desenvolvimento das assembleias de girinos anuros. Nossa hipótese foi de que as assembleias de ambientes afetados pela descarga de rejeitos da barragem apresentam maiores anomalias no organismo do que aquelas de áreas não impactadas. Ao todo, nós analisamos quatro atributos bilaterais de 25 espécies de 5 famílias, dos quais somente a distância narina-focinho apresentou alta repetibilidade. As comunidades de girinos provenientes de três áreas, uma diretamente afetada pelo rejeito (AA), uma cronicamente afetada pela atividade mineradora (CA) e uma de uma unidade de conservação (AP), foram comparadas através de uma pGLMM e tiveram diferenças nos índices de AF (IAF) explicadas pelo acaso, mesmo quando a variação ambiental e as variâncias filogenética e taxonômica entre elas foram consideradas. Portanto, a hipótese inicial foi refutada. Contudo, observamos respostas idiossincráticas entre diferentes espécies, e algumas demonstram um padrão esperado (IAF de AA>CA>AP), enquanto outras apresentaram o padrão contrário.

Algumas espécies parecem mais sensíveis a passagem do rejeito como *Dendropsophus decipiens*, *D. minutus* e *S. fuscomarginatus*, por outro lado, outras espécies parecem apresentar certa adaptação à presença do rejeito por serem mais abundantes e frequentes em áreas AA como *Boana faber*, *B. crepitans*, *B. semilineata*, *D. elegans* e *S. eurydice*. Dessa forma, é possível que, para algumas espécies, a resposta da assimetria flutuante seja distinta da resposta observada em escala de comunidade. Por isso, sugerimos a produção de trabalhos de assimetria flutuante focados em população de espécies como *Physalaemus cuvieri* e *D. minutus*, que foram encontrados em todas as áreas da nossa amostragem e que apresentaram índices assimétricos variáveis de acordo com o tipo de área.

Palavras-chave: anomalias; Anura; contaminação ambiental; mineração; pGLMM

Abstract

Mining activity reduces significantly local biodiversity and water bodies in its surroundings. These impacts are exacerbated in cases of environmental disasters, such as the one caused by the rupture of the Fundão Dam. Amphibians are considered environmental bioindicators, and one way they respond to environmental stressors is through developmental instability, assessed by fluctuating asymmetry (FA). Our objective was to examine sets of samples collected in areas affected by the Fundão Dam mudflow and compare them with samples from unaffected areas using FA parameters to evaluate the presence of persistent effects of tailings on developmental disturbances in anuran tadpole assemblages. Our hypothesis was that assemblages from environments affected by tailings discharge from the dam would exhibit greater organismal anomalies than those from unaffected areas. In total, we analyzed four bilateral attributes of 25 species from 5 families, of which only the nostril-snout distance showed high repeatability. Tadpole communities from three areas, one directly affected by tailings (AA), one chronically affected by mining activity (CA), and one from a conservation unit (AP), were compared using a pGLMM and differences in FA levels were explained by chance, even when environmental variation and phylogenetic and taxonomic variances among them were considered. Therefore, the initial hypothesis was refuted. However, we observed idiosyncratic responses among different species, with some showing an expected pattern (FA of AA>CA>AP), while others exhibited the opposite. Some species appear to be more sensitive to tailings passage, such as *Dendropsophus decipiens*, *D. minutus*, and *Scinax fuscomarginatus*; on the other hand, other species seem to demonstrate some adaptation to the presence of tailings as they are more abundant and frequent in AA areas, such as *Boana faber*, *B. crepitans*, *B. semilineata*, *D. elegans*, and *Scinax* sp. 23. Thus, it is possible that, for some species, the response of fluctuating asymmetry differs from the response observed at the community scale. Therefore, we suggest producing fluctuating asymmetry studies focused on species populations such as *Physalaemus cuvieri* and *D. minutus*, which were found in all areas of our sampling and exhibited variable asymmetrical indices according to the type of area.

Keywords: anomalies; Anura; environmental contamination; mining; pGLMM

1- INTRODUÇÃO

A mineração é uma atividade econômica importante para muitos países e representa 4% do PIB brasileiro (OLIVEIRA, 2019; LEÃO & RABELO, 2023). Apesar de sua importância, essa atividade causa grandes impactos ao meio ambiente. As áreas de mineração são geralmente criadas em regiões com muita abundância de recursos hídricos, biodiversidade e outros recursos naturais (CARMO *et al.*, 2020; MECCHI & SANCHES, 2010). Nessas áreas, são gerados rejeitos líquidos, sólidos e gasosos que são acumulados em barragens. Os rejeitos dessas atividades podem ser materiais geológicos (rochas sedimentares, metamórficas e ígneas) e produtos do processamento dos minerais extraídos, incluindo metais pesados (LOTTERMOSER, 2003; WICHER, 2000).

Toda atividade referente à mineração culmina na destruição da vegetação daquele recorte, impedindo sua regeneração e expondo o solo mais sensível a processos de erosão que afetam corpos d'água em seu entorno (MECCHI & SANCHES, 2010). Por isso, o solo do entorno de um complexo de mineração contém, além de outros rejeitos, muitos metais que são facilmente lixiviados e inseridos em ecossistemas (DA MARTINS *et al.*, 2011) e, em altas concentrações, podem ser tóxicos aos organismos se diretamente expostos a eles (HAYWOOD *et al.*, 2004). A contaminação por metais pesados é especialmente alarmante, já que eles podem ser inseridos nas redes tróficas através da bioacumulação (SAIDON *et al.*, 2024; SHAAPER *et al.*, 2013; MEIS, 1999), influenciada pelo seu comportamento alimentar (INTAMAT *et al.*, 2016), resultando em uma difícil remoção desses metais nos ecossistemas (SAIDON *et al.*, 2024). Quanto maior o nível trófico do indivíduo, maior é a sua área de vida e maior o risco de contaminação, sendo esse risco dependente do grau de exposição ao ambiente, do tamanho e crescimento do organismo e da própria capacidade de controlar sua homeostase (CHERNOVA & LYSENKO, 2019). Organismos que se alimentam de sedimentos, como é o caso de alguns invertebrados e peixes, podem estar mais expostos a contaminação por metais se comparados a organismos de colunas d'água (CROTEAU *et al.*, 2005), isso porque alguns tipos de biofilmes autotróficos são capazes de imobilizar alguns tipos de metais, alterando sua biodisponibilidade de acordo com cada tipo de organismo, ou seja, as respostas do contato direto com os metais variam entre diferentes organismos, a depender da sua própria capacidade de se adaptar, superar ou assimilar esses metais, além de mudanças comportamentais e respostas metabólicas associadas à exposição (CROTEAU *et al.*, 2005; CRUZ-SANTIAGO *et al.*, 2023).

Os efeitos da contaminação de rejeitos sobre a biodiversidade podem modificar as paisagens (fragmentação de habitats e alterações no clima, etc...), e até modificar a composição e

diversidade funcional de comunidades (BANDINI *et al.*, 2019), alterando a estrutura de comunidades, riquezas e abundâncias, afetando também a dinâmica demográfica de populações a longo prazo, como demonstrado para microalgas de biofilmes (BARRANGUET *et al.*, 2002), macro invertebrados (LEAL *et al.*, 2023), ácaros (BUCH *et al.*, 2020) e herpetofauna (LEDUC *et al.*, 2012; OTERO *et al.*, 2018). A exposição a rejeitos pode desencadear diversos distúrbios morfológicos e fisiológicos como a alteração do período de floração e diminuição no crescimento de plantas, desregulação de ciclos de vida em invertebrados (ESPINDOLA *et al.*, 2016; DA SILVA CRUZ *et al.*, 2020), redução do peso e estresse fisiológico em roedores (NUNES *et al.*, 2001), o que pode afetar, de modo geral, as interações e processos ecossistêmicos.

1.1- Cenário do rompimento da barragem do Fundão

No Brasil, existem vários tipos de barragens, dentre as quais há as que acumulam água para a geração energia e aquelas que contêm rejeitos de mineração, consideradas as que mais impactam o ambiente. Minas Gerais possui um histórico de rompimentos de barragens registradas desde 1986, com o rompimento da barragem Itaminas, em Itabirito (LACAZ *et al.*, 2017). Seguida pelo rompimento de sete outras barragens nos municípios de Macacos, Nova Lima; Zona da Mata mineira (CARVALHO, 2018; LACAZ *et al.*, 2017), Cataguases (ANA, 2016), Miraf (DUTRA, 2018; LACAZ *et al.*, 2017; CARVALHO, 2018); em Itabirito (ANA, 2016), Mariana (LACAZ *et al.*, 2017), e a mina do Córrego do Feijão, em Brumadinho que ocorreu em 2019. Antes do rompimento da barragem do Fundão, em 2015, o Rio Doce já era considerado a maior fonte de sedimentos na região leste da América do Sul e sua bacia era considerada a maior possuidora dos complexos minerais da América Latina. Desse modo, os impactos resultantes de desmatamento, erosão e poluição dos canais hídricos eram considerados inevitáveis (OLIVEIRA & QUARESMA, 2017). A bacia do Rio Doce contempla mais de 83 mil quilômetros quadrados, sendo sua maior porção localizada em Minas Gerais e a menor no estado do Espírito Santo (DE CARVALHO AGUIAR *et al.*, 2020). As características morfológicas da bacia permitem que ela seja dividida em três regiões: Alto Rio Doce, que contempla as nascentes até a confluência do rio Piracicaba; Médio Rio Doce, passando pelos rios Casca, Matipó, Caratinga-Cuieté e Manhaçu chegando até o Rio Guandu, esse último no território do estado de Espírito Santo; e o Baixo Rio Doce, que abrange regiões de colinas, tabuleiro e parte da planície costeira do Espírito Santo até a foz no Oceano Atlântico (COELHO, 2007; 2009; HORA *et al.*, 2013).

Dentro dessa extensão territorial, a empresa privada de mineração Samarco, que pertence às companhias Vale S.A. e BHP Billiton, localiza-se em Mariana, na região do Alto Rio Doce e é responsável pelas barragens do Fundão, Germano e Santarém, produzindo uma grande quantidade de ferro que é exportada globalmente (ALMEIDA *et al.*, 2018; ESPINDOLA *et al.*, 2016; BANDINI *et al.*, 2019). Os rejeitos, misturas de brita e processados de metais econômicos, minerais ou carvão (KOSSOFF *et al.*, 2014), são armazenados nessas barragens (ALMEIDA *et al.*, 2018), que foram construídas para controle de sedimentos (BRANDT 2000). No dia cinco de novembro de 2015, a barragem do Fundão rompeu-se no Rio do Carmo (ESPINDOLA *et al.*, 2016), atingindo Bento Rodrigues, Paracatu de Baixo, Gesteira, Barra Longa e Camargo, distritos de Mariana. Foram impactados diretamente, cerca de 14,69 km² de terras, incluindo o Parque Estadual do Rio Doce (PERD), e áreas de preservação permanente (ESPINDOLA *et al.*, 2016). Nessa região, encontra-se a unidade Germano, operada pela Samarco (ESPINDOLA *et al.*, 2016; BANDINI *et al.*, 2019). A barragem continha cerca de 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração de ferro (IBAMA, 2015; GIROTTO *et al.*, 2020) que foram liberados no ambiente, enquanto a lama percorreu 600 quilômetros (DE SOUZA *et al.*, 2022; GIROTTO *et al.*, 2020) se estendendo pelos rios Gualaxo, do Carmo e Doce, até chegar no estado do Espírito Santo. (ESPINDOLA *et al.*, 2016). Foram encontrados na água do Rio Doce elementos como arsênico, cádmio, cobre, crômio, níquel e mercúrio (FERNANDES *et al.*, 2016). Os metais encontrados em maior quantidade nos rejeitos, comparando solo e sedimentos não afetados, foram ferro e manganês (OEHRIG *et al.*, 2024). Estes contaminantes podem afetar o pH do solo, tendo o potencial de modificar a vegetação local a longo prazo (IBAMA, 2015).

A lama afetou mais de 70 quilômetros a jusante da barragem rompida, cobriu uma área ribeirinha de 11,766 km² e levou mais 4,57 km² de Mata Atlântica (OMACHI *et al.*, 2018). Fragmentos de mata ciliar foram devastados e variáveis essenciais para a manutenção da homeostase aquática foram alteradas, afetando principalmente os corpos d'água (LOPES, 2016), e desestruturando as comunidades biológicas locais. A lama promoveu assoreamento dos cursos d'água, perda e fragmentação de habitats e destruição de áreas de preservação com vegetação nativa da Mata Atlântica (IBAMA, 2015). O elevado teor dos rejeitos mobilizou os solos das margens, o que facilitou a entrada de outros poluentes e tóxicos, resultando num impacto ainda maior de nutrientes dispostos no corpo hídrico (PINTO-COELHO, 2015). Após o acidente, a turbidez encontrada foi de 9,168 NTU no distrito de Conselheiro Pena, sendo o valor máximo permitido pela legislação para turbidez das águas é de 100 NTU. A água opaca

cheia de rejeitos impedia a entrada de luz nos corpos d'água, reduzindo taxas metabólicas e fotossintéticas, impactando severamente os ambientes aquáticos. A turbidez começou a diminuir a partir do mês de julho de 2016, devido a capacidade do Rio Doce de depurar os rejeitos e deslocar cursos d'água, carregando poluentes que ficam fixos às margens, o que explica a melhoria na qualidade da água após um curto período (DUTRA, 2018), mesmo que os parâmetros para metais na água já estivessem acima do limite legal, antes mesmo do rompimento (DIAS *et al.*, 2018).

1.2- Anuros como organismos modelo para avaliação de impactos

Anfíbios estão entre os organismos mais afetados por contaminantes ambientais por habitarem comunidades aquáticas e terrestres em diferentes fases de suas vidas devido ao desenvolvimento indireto da maioria das espécies. Além disso, eles utilizam diferentes tipos de ambientes para migração e crescimento e possuem a pele e alguns órgãos extremamente permeáveis, aumentando a absorção de contaminantes ambientais quando expostos a eles (ALLENTOFT & O'BRIEN, 2010; BURLIBAŞA & GAVRILĂ, 2011; UCHIYAMA & KONNO, 2006; HOPKINS, 2007). Essa exposição pode inibir o desenvolvimento, crescimento, locomoção e fisiologia, além de estender seu período de desenvolvimento até a metamorfose (DING *et al.*, 2022). Contaminantes tóxicos como metais entram em cadeias alimentares pela absorção de água, pelo epitélio e pela predação de organismos que tiveram um contato direto com eles (INTAMAT *et al.*, 2016). Os anfíbios, em especial, podem incorporar os metais presentes em seus habitats através do contato com solo ou água contaminados, o que pode ser amplificado quando esses ambientes são ácidos. Se o contato com metais ocorre de forma prolongada, os organismos podem sofrer extinções locais ou se tornarem mais tolerantes (AMIARD-TRINQUET, 2019). A tolerância adaptativa dos indivíduos ocorre por seleção natural com o surgimento de novas gerações cada vez menos afetadas pela presença dos contaminantes (AMIARD-TRINQUET, 2019). Além disso, Vedamanikam & Shazilli (2008) sugerem que a seleção de tolerância depende dos tempos de geração e de exposição de cada espécie, de forma que, se algum indivíduo tem contato com ambientes lênticos sem presença de metais ou demais poluentes, sua tolerância pode ser perdida, e o contato com esses elementos volta a ser muito nocivo. A tolerância de uma espécie adaptada à presença de um poluente, pode ser relacionada com o limite de poluentes que é absorvido; a desintoxicação dos elementos que já foram incorporados e/ou o aumento da capacidade de eliminação desses poluentes (AMIARD-TRINQUET, 2019).

A baixa capacidade de dispersão dos anuros, torna-os muito suscetíveis a impactos ambientais locais (BLAUSTEIN & JOHNSON, 2003) e o seu ciclo de vida conecta e impacta comunidades aquáticas e terrestres (JUNCA *et al.*, 2017). Suas características fisiológicas permitem a exploração de recursos de diferentes qualidades, conectando teias tróficas aquáticas e terrestres (HOPKINS, 2007), o que os torna importantes elos nas teias alimentares, atuando tanto como presas quanto como predadores (ALLENTOFT & O'BRIEN, 2010).

Além disso, essas comunidades possuem um enorme papel na biodiversidade do ambiente e para anfíbios, especialmente os anuros, corpos hídricos são sua garantia de sobrevivência em ambas as fases da vida: larval e adulta. No entanto, muitos outros fatores além da contaminação hídrica podem desequilibrar o ecossistema. A temperatura, se flutuante, afeta a distribuição e concentração de oxigênio, ameaçando muitos organismos. Os índices extremos de pH podem ser letais ou afetar o desenvolvimento dos indivíduos (INTAMAT *et al.*, 2016). Corpos hídricos afetados por rejeitos de uma barragem, tem turbidez e assoreamento causados pela lixiviação desses rejeitos (ANA, 2016). Para além da contaminação por rejeitos, os poluentes como pesticidas também causam grandes alterações negativas. Sparling & Fellers (2009), demonstraram em seu estudo quão prejudiciais são os pesticidas, em um experimento onde ele mostra que apesar de cada espécie reagir de uma forma diante desses poluentes, como morte, atraso ou aceleração na metamorfose, as concentrações de sedimentos afetam a assiduidade de girinos nas lagoas e mesmo a quilômetros de distância da aplicação de pesticidas, os corpos hídricos ainda são afetados.

A fase larval dos anuros representa um importante período de desenvolvimento ontogenético em que ocorrem transformações intensas e especializações associadas ao comportamento alimentar e percepção sensorial que são distintas da fase adulta (KENTWOOD, 2007). Girinos são organismos muito sensíveis, podendo ser afetados por impactos ambientais, bioacumulação e fatores climáticos no ambiente, que atingem todos os seus estágios de desenvolvimento até sua fase adulta, havendo reflexos em sua morfologia (JITHIN *et al.*, 2022; KENTWOOD, 2007), desenvolvimento (MEIS, 1999) e, conseqüentemente, valor adaptativo (SPARLING & FELLERS, 2009). Quanto à cobertura vegetal e o tipo de lago, a interação entre a contaminação por metais pesados e a temperatura podem afetar o comportamento e atividades das larvas, como mostram Jithin *et al.* (2022), cujos resultados demonstram que girinos em lagoas impactadas por rejeitos e lagoas controle apresentaram os mesmos padrões de atividade nos casos em que não houve flutuação da temperatura à noite. No entanto, o mesmo estudo mostrou que o tamanho dos girinos em lagoas controle foi menor do que nas lagoas afetadas. Em

contraposição, Qureshi *et al.* (2015) coletaram anuros de localidades com indústrias que demonstraram uma diminuição do seu comprimento, peso e uma maior bioacumulação quando comparadas com lagoas controle.

Estressores ambientais podem afetar os fenótipos de girinos. Lagos temporários contaminados podem ameaçar espécies colonizadoras e diminuir suas taxas de sobrevivência, assim como afetar suas taxas de desenvolvimento até a metamorfose (JAMES & LITTLE, 2003; PATAR *et al.*, 2016; JARA *et al.*, 2019; LEFCORT *et al.*, 1998; GIROTTO *et al.*, 2020; SPARLING & FELLERS, 2009). A exposição a poluentes e metais em lagos contaminados também reduz as respostas à sinais químicos de predadores e diminui a velocidade de nado (LEFCORT *et al.*, 1998; JAMES & LITTLE, 2003; GIROTTO *et al.*, 2020). A presença de predadores em si pode causar mudanças morfológicas, como na proporção em suas nadadeiras em relação ao corpo, além de mudanças comportamentais (THIEMANN & WASSERSUG 2000). Uma consequência negativa nas mudanças das taxas de desenvolvimento causadas por estressores ambientais é que o atraso na metamorfose torna os girinos mais vulneráveis à seca e predação, enquanto sua aceleração pode trazer consequências morfológicas e fisiológicas como redução do comprimento de membros e estresse oxidativo (GOMEZ-MESTRE *et al.*, 2013).

De modo geral, anuros possuem diferentes níveis de sensibilidade ambiental de acordo com a biologia de cada espécie e com os tipos de poluentes aos quais eles são expostos (COSTA & NOMURA, 2016; OTERO *et al.*, 2018). Devido às múltiplas respostas morfológicas e fisiológicas diante de estressores, sua importância trófica, sensibilidade e extinção iminente, anfíbios podem ser utilizados como bioindicadores, também chamados de sentinelas (INTAMAT *et al.*, 2016). Eles chamam atenção para os efeitos de contaminantes no ambiente em que vivem (STOLYAR *et al.*, 2008; COSTA & NOMURA, 2016; DA ROCHA BRAGA *et al.*, 2022), evidenciam índices de poluição ambiental e são também usados em estudos de desenvolvimento embrionário, biologia celular, genotoxicidade e qualidade de água (BURLIBAŞA & GAVRILĂ, 2011). Estudos relacionados a tecidos celulares de anfíbios e toxicidade, são publicados desde 1977, o que mostra que anfíbios e ecotoxicologia estão envolvidos a décadas, muito pelo fator de declínio populacional global desses organismos (MARTINHO *et al.*, 2022).

1.3- A assimetria flutuante como ferramenta para avaliação dos impactos

Uma das formas pelos quais os organismos, incluindo os anfíbios (PALMER, 1994), respondem aos estressores ambientais é através de instabilidades no desenvolvimento (ID), que se

expressam a partir de processos que desregulam o desenvolvimento preciso dos indivíduos, envolvendo mudanças em taxas celulares e até alterações em sua forma. As Ids podem ser expressas através de alguns tipos de assimetrias, que são resultado da incapacidade de organismos de controlarem seus processos ontogenéticos e de chegarem a uma expressão de genes e caracteres já predeterminada (MØLLER & SWADDLE; 1997).

A assimetria flutuante (AF) é uma das formas de se avaliar as IDs, constituindo em um índice de estresse ambiental calculado através da análise de variações de atributos entre lados direito e esquerdo do corpo de indivíduos bilaterais (GRAHAM *et al.*, 2010; MØLLER & SWADDLE; 1997). Também pode ser caracterizada como um índice de ruído ontogenético (ZAKHAROV *et al.*, 2020) que prediz o valor adaptativo dos indivíduos perante as flutuabilidades ambientais (DONGEN, 2006), podendo ser associada como uma importante ferramenta de biomonitoramento que detecta desvios e estresses que impedem a simetria perfeita de um indivíduo bilateral (HENRIQUES & CORNELISSEN, 2019; PIGNATARO *et al.*, 2023), como um biomarcador que detecta respostas do ecossistema diante de impactos ambientais (PIGNATARO *et al.*, 2023; IVANOV *et al.*, 2015), e como um amortecedor de estresses que fornece medidas como resultado dos ruídos do desenvolvimento sofridos (PALMER & STROBECK, 1986; DIDDE & RIVERA, 2019).

Animais assimétricos crescem mais devagar se comparados a animais simétricos (MØLLER & MANNING, 2003). Desse modo, a assimetria flutuante tem ligação direta com a instabilidade do desenvolvimento de um organismo no ambiente, aumentando quando modificações adaptativas falham em corrigir os efeitos do estresse sobre o fenótipo (GRAHAM *et al.*, 2010). Além disso, ela poder ser detectada antes da seleção natural atuar sobre alterações ontogenéticas e outros importantes atributos biológicos adaptativos (IVANOV *et al.*, 2015; ESTES *et al.*, 2006).

Em termos de comunidade, a assimetria flutuante é uma ótima opção para avaliar respostas diante de fatores bióticos e abióticos (HENRIQUES & CORNELISSEN, 2019). Por isso, a AF é aplicada no monitoramento de populações e comunidades biológicas de áreas afetadas por impactos ambientais (DONGEN, 2006). Vários estudos demonstraram correlação entre instabilidade do desenvolvimento, avaliada pela assimetria flutuante e concentrações de metais pesados em animais como peixes (ESTES *et al.*, 2006; HRENCHUK, 2007; MONNA *et al.*, 2011), anuros (ZHELEV *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2017) e mamíferos (NUNES *et al.*, 2001;

SÁNCHEZ-CHARDI *et al.*, 2013). Apesar disso, essa correlação pode não ser significativa a depender da população e do atributo analisados (HRENCHUK, 2007).

Tendo em vista que impactos ambientais são grandes estressores para diferentes organismos e sua consequência pode ser o desequilíbrio no desenvolvimento, o objetivo deste trabalho é examinar conjuntos de amostras que foram coletadas em áreas diretamente afetadas pela lama da barragem do Fundão e compará-las com amostras de áreas não afetadas através de parâmetros da assimetria flutuante, visando avaliar a presença de efeitos persistentes do rejeito sobre distúrbios no desenvolvimento das assembleias de girinos anuros.

A hipótese deste trabalho é de que as assembleias de ambientes afetados pela descarga de rejeitos de metais da barragem do Fundão, apresentam maiores anomalias no organismo do que aquelas de áreas não impactadas. Essas anomalias incluem AF, bioacumulação, macromutações, aumento de susceptibilidade a doenças e deformidades morfológicas, dentre outros (COOKE, 1981; STOLYAR *et al.*, 2008) e a AF será utilizada como índice para o teste desta hipótese.

2- MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em duas campanhas, de 16 a 26 de janeiro e de 27 de fevereiro a 10 de março de 2023. Para a amostragem dos girinos, nós selecionamos ambientes lênticos (lagoas, poças e açudes) em áreas agudamente afetadas (**AA**; 13 lagoas e açudes em regiões às margens do Rio Gualaxo ou em áreas diretamente atingidas pela lama da barragem do Fundão, no epicentro da tragédia). Para comparações, nós selecionamos outros dois conjuntos de áreas controle. O primeiro deles constituiu em corpos d'água cronicamente afetados pela atividade mineradora (**CA**; 17 lagoas e açudes à jusante das mineradoras, afetadas pela poeira, lixiviação e/ou poluição sonora das áreas do Complexo Minerário Germano, mas não diretamente afetadas pela lama). Essas lagoas foram selecionadas com o intuito de isolarmos os efeitos da atividade mineradora em si dos efeitos agudos causados pela lama. O segundo conjunto de corpos d'água controle (**AP**) foram selecionados na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Serra do Caraça, uma área protegida há mais de 30 anos (IBAMA, 1994), localizada a montante do Complexo Minerário Germano (Figura 1, Tabela S1 no Anexo) que não sofre impactos diretos da atividade mineradora. Em cada corpo d'água nós realizamos um registro fotográfico e a aferição de seus dados físico-químicos como Ph, com uma Hanna Multiparâmetros Hedge HI11310; condutividade elétrica, com uma Hanna Multiparâmetros

Hedge HI2030-02; oxigênio dissolvido, com uma Hanna HI9147-04 e turbidez, com um AKSO TU430 (Tabela S3 no Anexo).

Em seguida, utilizamos o método de amostragem ativa em áreas próximas às margens de cada corpo d'água durante duas horas (duas pessoas/hora) com o auxílio de duas peneiras com diâmetro de 40 cm e malha de 3 mm. Após 30 minutos de amostragem, se nenhum girino fosse encontrado, registrávamos a ausência de girinos e seguíamos para o próximo ponto. Todo o material foi triado para a identificação das espécies (Tabela S2 no Anexo) e o registro das abundâncias e se encontra tombado no anexo de girinos da coleção Herpetológica do Centro de Coleções Taxonômicas da UFMG (CCT-UFMG).

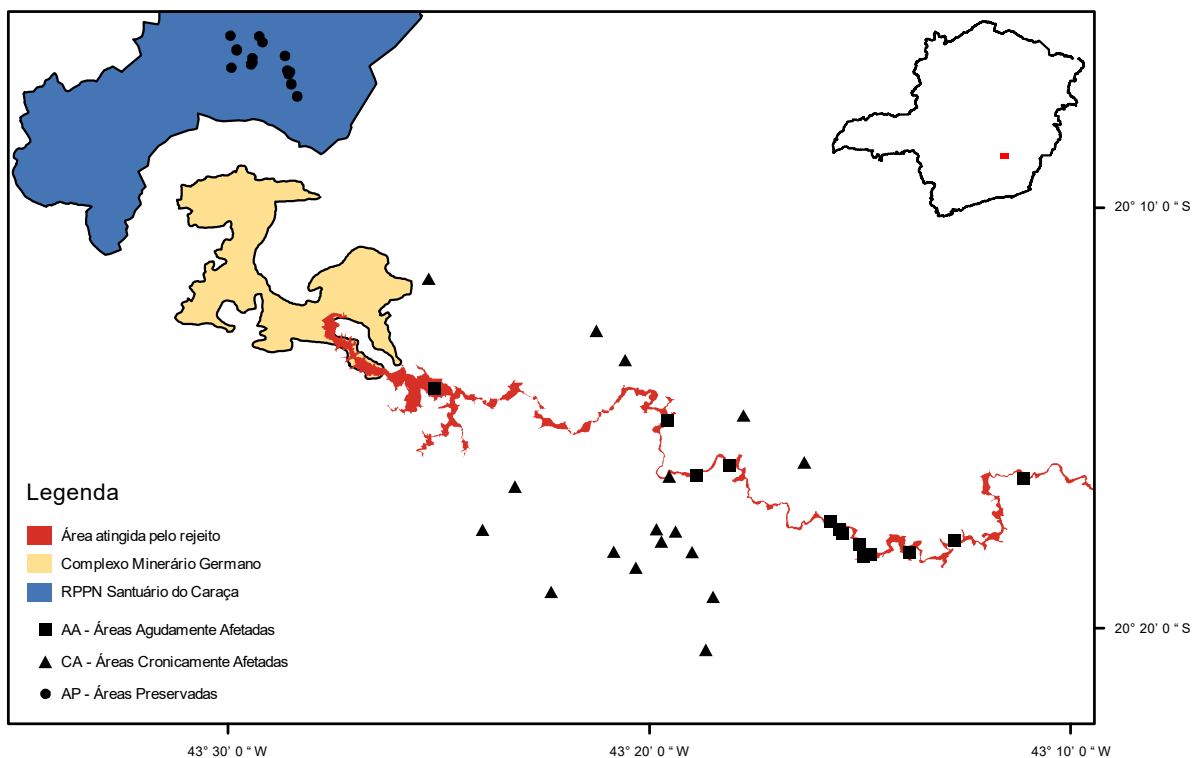


Figura 1 – Mapa georreferenciado das áreas amostradas e suas respectivas lagoas que constaram a presença de girinos.

Durante cada coleta, os girinos foram acondicionados em sacos plásticos, e ao fim da coleta eutanasiados em uma solução aquosa de lidocaína (5%) segundo as recomendações da resolução 301/2012 do Conselho Federal de Biologia (CFBio, 2012). Em seguida, realizamos uma pré-triagem do material de cada ponto, separando os girinos por morfotipos, fixando-os e armazenando-os separadamente em garrafas plásticas com uma solução de formol 10%, etiquetadas com o nome do ponto amostral. Para os girinos de *Scinax*, de difícil identificação

específica através da morfologia, nós retiramos tecidos de alguns indivíduos para a identificação molecular.

As identificações das espécies foram realizadas com o auxílio de um estereomicroscópio a partir da chave interativa disponível no aplicativo “Anfíbios do Quadrilátero Ferrífero: chaves de identificação para adultos e girinos” (PEZZUTI *et al.*, 2021). Os girinos foram individualmente identificados, separados em lotes por espécie e ponto amostral, acondicionados em tubos tipo *falcon* (15 ou 50ml) com uma nova solução de formol 10% e tombados na coleção do CCT-UFMG. Para essa triagem e para fins de análise, nós utilizamos apenas os girinos entre os estágios 28 e 38 de acordo com a tabela de Gosner (1960), pois indivíduos nesses estágios não estão recém eclodidos, nem iniciando o clímax metamórfico.

Os girinos de *Scinax* foram identificados através de comparações entre fragmentos do gene mitocondrial citocromo oxidase c, subunidade 1 (CO1) gerados por nós e disponíveis na literatura (ARAUJO-VIEIRA *et al.*, 2023). Para isso, o DNA genômico foi extraído através do protocolo padrão de fenol-clorofórmio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). O fragmento da CO1 foi obtido via reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores AnF1 (5'-ACHAAYCAYAAAGAYATYGG-3') e AnR1 (5'-CCRAARAATCARAADARRTGTTG-3') (LYRA *et al.*, 2017). A solução das reações de PCR consistia em um volume de 15 µL por amostra, contendo 30 ng de DNA genômico, 1x de tampão, 1,25 µM de cada primer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,72 µg de albumina de soro bovino (BSA), 3 mM de dNTPs e 0,625 U de Platinum™ Taq DNA polimerase. As reações de PCR foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação do DNA genômico a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação a 90°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 40 minutos e extensão a 72°C por um minuto. Para completar a extensão dos amplicons, nós adicionamos uma etapa final a 72°C por sete minutos. Os fragmentos amplificados foram purificados para a remoção de resíduos da PCR utilizando-se o protocolo de polietileno glicol (PEG) 20% (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2015) e sequenciados pela Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz em um sequenciador de DNA por eletroforese capilar automatizado ABI 3730 XL (Thermo Fisher Scientific™). Nós verificamos os eletroferogramas e corrigimos os erros de leitura no programa SeqScape 2.6 (Applied Biosystems™).

A identificação molecular em si consistiu na submissão das sequências geradas à ferramenta Nucleotide BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com o intuito de identificar os espécimes analisados por Araujo-Vieira *et al.* (2023) cujas sequências apresentam a maior

porcentagem de identidade (i.e., similaridade) com a nossas. Nós consideramos a identificação inequívoca quando a porcentagem de identidade foi $> 98\%$.

Após a identificação taxonômica de todos os indivíduos, foram selecionou-se espécimes para fotodocumentação. Em cada lagoa, foram fotografadas somente as espécies cuja abundância mínima foi de três girinos, número mínimo a partir do qual conseguíamos calcular a variância populacional da AF dos atributos analisados. Girinos com macroanomalias em atributos bilaterais foram eliminados nessa etapa, uma vez que a AF consiste em desvios sutis e quase imperceptíveis da simetria bilateral (SANSEVERINO & NESSIMIAN, 2008). Para as espécies com abundância entre três e 30 girinos, todos os indivíduos foram fotografados. Para as espécies com abundância maior que 30 indivíduos, nós selecionamos um máximo de 30 girinos do lote aleatoriamente. Para cada espécime selecionado foram obtidas três fotos, uma dorsal e uma de cada lateral do corpo. As fotografias foram obtidas a partir de uma câmera Canon EOS 60D com uma lente macro de 60mm e uma estativa com iluminação artificial. Os girinos foram fotografados submersos em água dentro de um aquário e apoiados sobre uma plataforma de lâminas, criada para posicioná-los em seus diversos tamanhos corretamente (SCHACHT & MCBRAYER, 2009).

A partir das fotos nós utilizamos o software *TpsUtil* versão 1.82 (ROHLF, 2023^a) para a conversão das fotos em arquivos *.tps e *TpsDig* versão 2.32 (ROHLF, 2023^b) para marcação dos pontos de referência (*landmarks*) para as medidas. As medidas, aferidas a partir das distâncias entre os pontos, foram calculadas com base na distância cartesiana entre eles pela seguinte fórmula “ $= \sqrt{(x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2}$ ” em que (x_1, y_1) e (x_2, y_2) representam as coordenadas dos pontos (como ilustrado pela Figura 2, abaixo). Essa fórmula resulta na distância entre os pontos em pixels que, na sequência, é multiplicada pela escala da foto, previamente aferida pelo *TpsDig*. Para selecionar os melhores pontos de referência, visando responder nossas hipóteses e objetivos, foram escolhidas as medidas dos diâmetros dos olhos, distância entre os olhos e as narinas de cada lado do corpo, distância entre os olhos e a ponta do focinho e distância entre os olhos e as narinas de cada lado do corpo (Tabela 1, Figura 3).

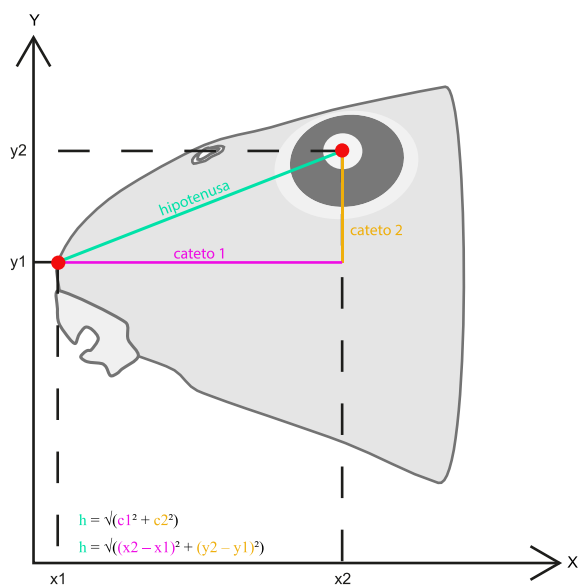


Figura 2 – Representação esquemática de um girino em vista lateral que exemplifica como é feito o cálculo da distância entre dois pontos.

Tabela 1 – Descrição das medidas dos marcros anatômicos selecionados (AOF, AON, DNF e DO), aferidas para as análises de assimetria flutuante.

Sigla	Descrição:	Adaptado de:
AOF	Distância da margem anterior do olho até a ponta do focinho	COSTA & NOMURA, 2016
AON	Distância da margem anterior do olho até o centro da narina	LAVILLA & SCROCCHI, 1986
DNF	Distância do centro da narina até o focinho	COSTA & NOMURA, 2016
DO	Diâmetro do olho	COSTA & NOMURA, 2016

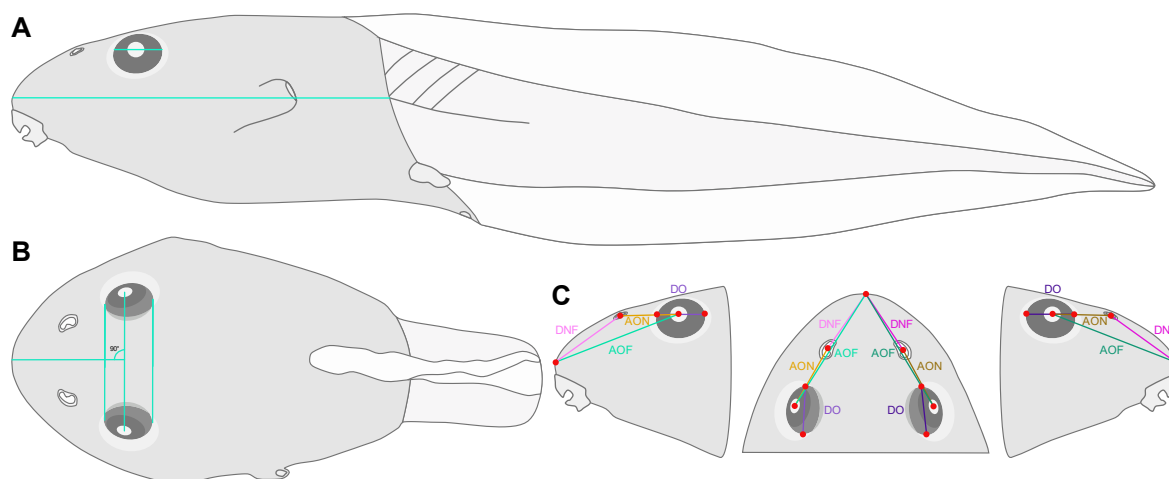


Figura 3 – Desenho esquemático de um girino:– A – em vista lateral B – em vista dorsal C – Representação das medidas aferidas nas vistas lateral e dorsal a partir dos pontos de referência em vermelho. As linhas azuis destacadas em A e B são linhas de guia utilizadas para padronização da aferição das medidas DO.

Cada medida foi aferida duas vezes, uma por cada medidor independente, de acordo com o método duplo-cego de (PALMER, 1994), para verificar a repetibilidade das medições. Para

realizar essa estimativa, nós calculamos a assimetria individual para cada atributo aferido por cada medidor a partir da fórmula $AF = (D_i - E_i)$, sendo D_i a medida do atributo no lado direito do indivíduo i , enquanto E_i é a medida desse atributo no lado esquerdo do mesmo indivíduo. Após essa etapa, nós realizamos regressões lineares entre os valores de AF obtidos pelos dois medidores para cada atributo analisado. As regressões foram feitas com a função *lm* do pacote *stats* v.4.2.1 (R CORE TEAM 2022) do software R v. 4.3.2 (R CORE TEAM 2022). A repetibilidade foi alcançada apenas em atributos cuja AF entre os dois medidores foi altamente correlacionada (i.e., $r > 0.7$; DORMANN *et al.*, 2013). Os valores médios das aferições dos dois medidores para os atributos que atingiram esse critério foram utilizados nas análises subsequentes.

Para avaliar qual o tipo de assimetria foi encontrada nos indivíduos, nós realizamos um teste t no software R tendo como variável preditora o lado do corpo (D e E) e como variável resposta as medidas aferidas em cada um dos lados. A assimetria é flutuante quando as diferenças entre os lados do corpo são explicadas pelo acaso ($p > 0,05$). No caso dos dados que não atenderam aos pressupostos do teste t (i.e., normalidade dos dados e homogeneidade dos resíduos), o teste de Mann-Whitney U, equivalente não paramétrico do teste de t , foi empregado. Para o teste t foram utilizadas as funções *byf.shapiro* e *lillie.test* dos pacotes *RVAideMemoire* v.0.9-81-2 e *nortest* v.1.0-4, respectivamente, como testes de normalidade dos dados de Shapiro-Wilk e de Lilliefors (HERVÉ, 2022; GROSS & LIGGES, 2015). Utilizamos também a função *leveneTest* do pacote *car* v.3.1-0 como teste da homogeneidade dos resíduos (FOX & WEISBERG, 2019); e por fim a função *t.test* do pacote *stats* como teste t . Para o teste de Mann-Whitney U foi usada a função *wilcox.test* do pacote *stats*.

Para o teste da assimetria flutuante entre as áreas amostrais, primeiramente nós calculamos o índice de assimetria flutuante populacional para cada espécie em cada lagoa através da fórmula

$$IAF = V \left| \frac{D - E}{(D + E)/2} \right|$$

Onde V é a variância, D é a medida de um atributo do lado direito do corpo e E é a medida do mesmo atributo do lado esquerdo do corpo. Depois disso, nós conduzimos uma análise *pglmm* no pacote *phyr* v. 1.1.0 (LI *et al.*, 2020), na qual as áreas amostrais foram a variável preditora e AF_p foi a variável resposta. Nós utilizamos as matrizes de covariância filogenética e covariância de identidades taxonômicas das espécies como variáveis aleatórias e as variáveis ambientais aferidas em cada lagoa como covariáveis do modelo. A árvore filogenética com as

espécies amostradas foi extraída de Portik *et al.* (2023) através da função *keep.tip* do pacote *ape* v.5.7.1 (PARADIS & SCHLIEP, 2019). As variáveis ambientais de cada lagoa (i.e., altitude, Ph, temperatura, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e turbidez) foram reduzidas através de uma análise de componentes principais (PCA) para evitarmos uma superparametrização dos modelos. Para tanto, nós implementamos a PCA no pacote *vegan* v.2.6-4 (OKSANEN *et al.*, 2018) do software R e realizamos a retenção de componentes principais (PCs) através de uma análise de distribuições *broken stick* (JACKSON, 1993). As variáveis ambientais foram representadas como o PC1 das variáveis (Figura S1 no Anexo, ver Resultados). O modelo final da *pglmm* foi do tipo gaussiano, estimado a partir da seguinte fórmula:

$$pglmm(vaf \sim area + param + (1|species_))$$

Onde *vaf* é o índice de assimetria flutuante populacional, *area* são as áreas amostrais (i.e., AA, CA e AP), *param* é a matriz de dados ambientais das lagoas e *species__* denota as matrizes de covariância filogenética e de identidade taxonômica. Por fim, o ajuste dos resíduos do modelo foi realizado a partir de uma checagem baseada em simulações realizada através do comando *simulateResiduals*, implementado no pacote *DHARMA* v.0.4.6 (HARTIG & HARTIG, 2022). Os resultados podem ser interpretados de 0 a 1, similar à uma regressão linear (ATAÍDES *et al.*, 2021).

3- RESULTADOS

Foram registrados 13.966 girinos pertencentes a 25 espécies durante a amostragem do trabalho. As espécies *Boana albopunctata*, *Boa. crepitans*, *Boa. faber*, *Boa. polytaenia*, *Boa. semilineata*, *Bokermannohyla* aff. *circumdata*, *Dendropsophus decipiens*, *D. elengans*, *D. minutus*, *Oloolygon longilinea*, *Scinax fuscomarginatus*, *S. squalirostris* (Hylidae), *Elachistocleis cesarii* (Microhylidae), *Leptodactylus mystacinus*, *Physalaemus cuvieri*, *P. orophilus* (Leptodactylidae), *Odontophrynus cultripes* (Odontophrynidae) e *Rhinella crucifer* (Bufonidae) foram identificadas através da chave interativa e atenderam aos critérios de inclusão nas análises (Tabela S2 no Anexo). Quanto às espécies de *Scinax* de difícil identificação morfológica, nós confirmamos a amostragem de *S. curicica*, *S. dolloi*, *S. hayii* e *Scinax* sp. 23 (*sensu* ARAUJO-VIEIRA *et al.*, 2023) através dos marcadores moleculares. As três últimas espécies constituem novos registros para a região do Quadrilátero Ferrífero. Como nós não amostramos tecidos de girinos de todos os lotes de *Scinax* e as larvas de *Scinax* sp. 23,

S. dolloi e *S. hayii* são indistinguíveis morfologicamente, nós representamos as três espécies como um mesmo ramo na árvore de Portik *et al.* (2023), referente a *Scinax perereca*.

Dos quatro atributos medidos em vistas dorsal e laterais, somente AOF em vista dorsal apresentou alta repetibilidade (AOF: $r = 0.9$, Tabela S4). As variâncias do atributo AOF foram homogêneas ($F_{(1, 3374)} = 0.8363$, $p = 0.3605$) mas os dados não foram normais (Shapiro-Wilk: $p < 0.01$ e Lilliefors $p < 0.01$). Por isso, nós realizamos um teste de Mann-Whitney U-test para avaliar a presença de assimetria direcional. As diferenças entre as medidas dos lados direito e esquerdo do corpo foram explicadas pelo acaso (teste de Whitney U: $W = 1477685$; $p = 0.061$), o que confirma que a assimetria de AOF é flutuante. A diferença absoluta dos desvios do atributo AOF (diferença entre os lados direito e esquerdo) variou entre 0.00003mm e 1.55316mm e nenhum indivíduo apresentou simetria bilateral perfeita (i.e., $LD - LE = 0$) em AOF.

O valor médio das assimetrias flutuantes populacionais das espécies amostradas na área AA foi de 0.0037934, enquanto esses valores foram 0.001871 e 0.007353 para as áreas CA e AP, respectivamente (Tabela 2). Contudo, essas diferenças foram explicadas pelo acaso ($p = 0.134$) (Figura 4tr). Ressaltamos que pode se considerar que há uma diferença marginal entre as áreas AA e AP ($p = 0.07$), revelando uma diminuição sutil das assimetrias flutuantes das comunidades das áreas afetadas pela lama quando comparadas às das lagoas da RPPN Santuário do Caraça. Houve também um efeito marginal dos parâmetros ambientais sobre os valores médios das assimetrias flutuantes (Efeito = -0.00001 , $p = 0.086$) (Tabela 2). O ajuste do modelo foi satisfatório (Figura S2 no Anexo). A altitude média das lagoas da Serra do Caraça é maior do que a das outras duas áreas (Figura S3 no Anexo), enquanto a turbidez é consideravelmente menor (Figura S4 no Anexo). As lagoas da área AA, diretamente afetadas pela lama, apresentam condutividades elétricas maiores do que as das demais áreas amostrais (Figura S5 no Anexo).

Tabela 2 – Resultados da análise de um modelo misto linear generalizado filogenético (pglm). CA = Áreas cronicamente afetadas; AP = Áreas preservadas; AA = Áreas agudamente afetadas. ¹Diferenças em relação à área AA.

Efeitos Fixos:				
	Valor	Erro padrão	Escore Z	valor de <i>p</i>
(Intercepto)	3.794×10^{-3}	2.531×10^{-3}	1.499	0.134
CA ¹	1.871×10^{-3}	1.200×10^{-3}	1.559	0.119
AP ¹	7.353×10^{-3}	4.099×10^{-3}	1.794	0.073
param	-9.666×10^{-6}	5.628×10^{-6}	-1.717	0.086
Efeitos aleatórios:				

	Variância	Desvio padrão
Covariância filogenética	1.947×10^{-10}	1.395×10^{-5}
Covariância taxonômica	3.252×10^{-6}	1.395×10^{-5}
Resíduos	7.557×10^{-6}	2.749×10^{-3}

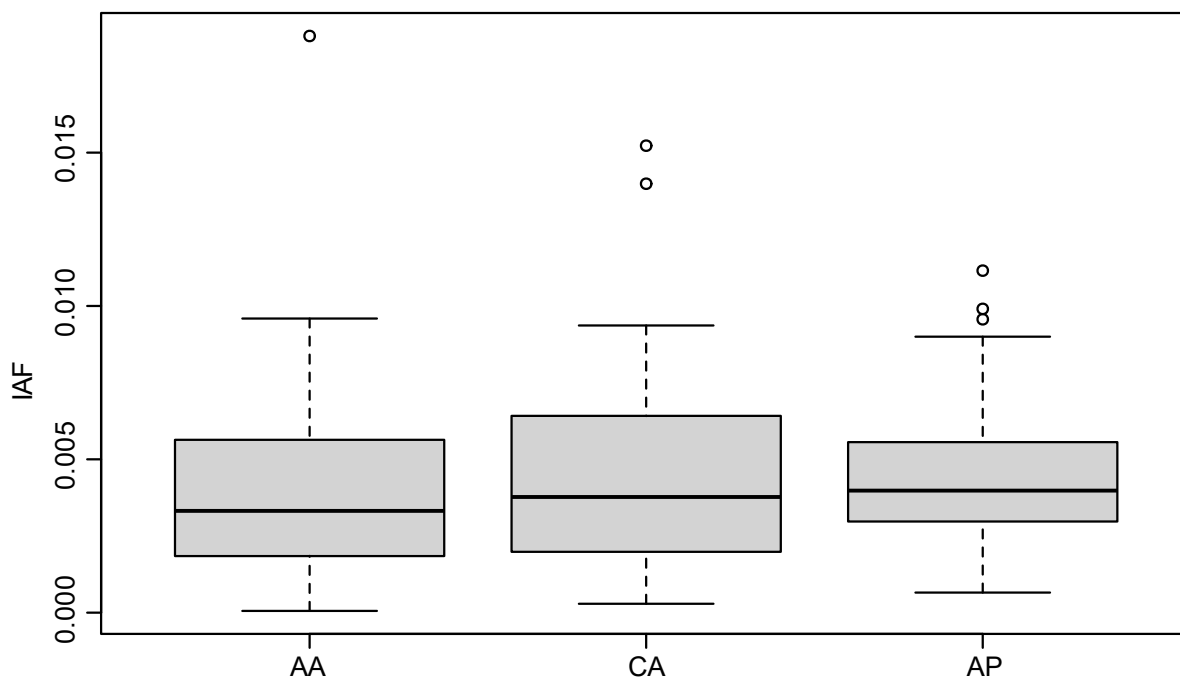


Figura 4 – Gráfico boxplot da variação na assimetria flutuante em cada tipo de área. AA= Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas.

Não foram observadas respostas comuns nas variâncias das AFs das espécies amostradas em duas ou três áreas (Figura 5). Em *B. crepitans* e *S. fuscomarginatus*, por exemplo, a variação média das AFs foi concordante com a nossa hipótese (AA>CA>AP) (Figura 5). Por outro lado, algumas espécies como *B. albopunctata*, *B. faber*, *D. minutus*, *P. cuvieri* e *S. eurydice* apresentaram padrões de variação contraditórios à nossa hipótese (Figura 5).

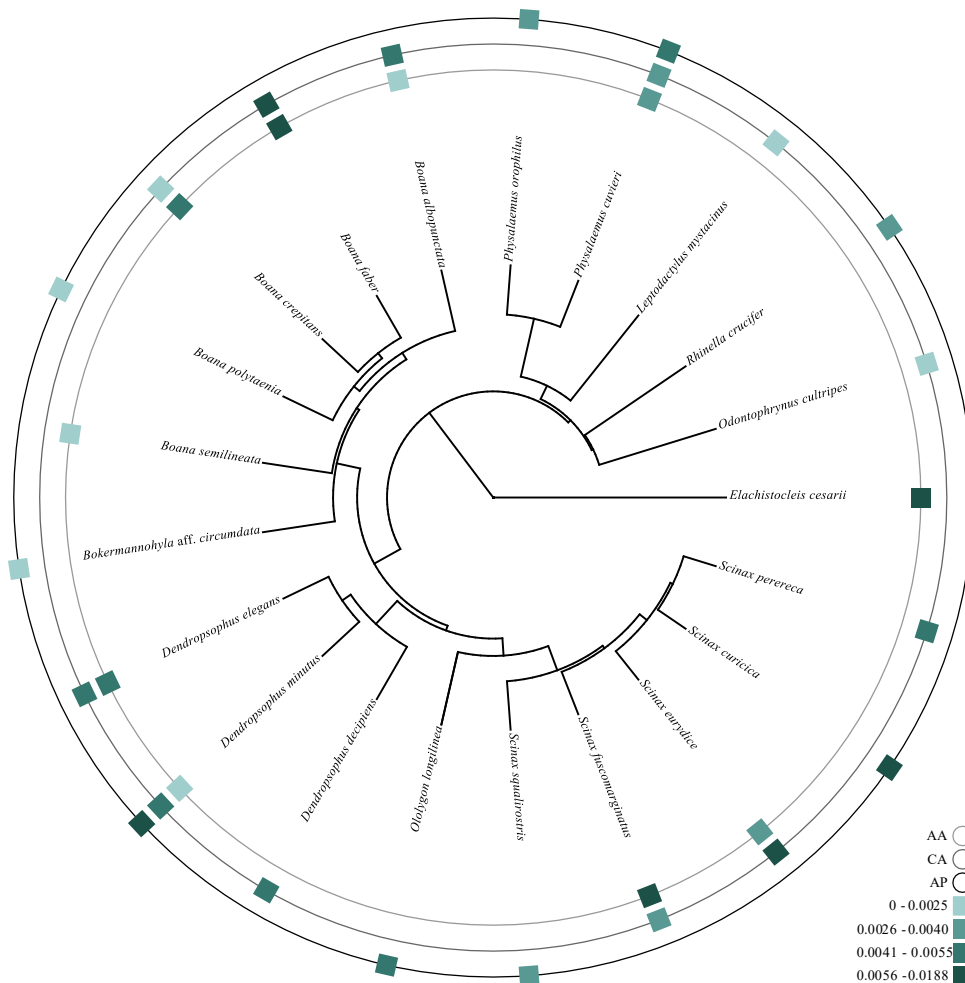


Figura 5 – Representação gráfica da variação média do IAF de cada espécie por área e a relação filogenética entre as espécies amostradas. O comprimento dos ramos é proporcional à distância filogenética entre as espécies. As cores dos quadrados representam os quartis da variação total, enquanto as cores das linhas dos círculos representam as diferentes áreas amostrais. AA= Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas.

4- DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar se as comunidades de girinos do Alto Rio Doce afetadas pela descarga de rejeitos do rompimento da barragem do Fundão apresentaram maiores níveis de assimetria flutuante (COOKE, 1981; STOLYAR *et al.*, 2008), quando comparadas com comunidades de áreas não afetadas pelo rompimento da barragem, assumindo que a hipótese da assimetria flutuante seria correta. Esperávamos também que os girinos presentes em Mariana fossem mais assimétricos que girinos da RPPN Santuário do Caraça, devido a influências antrópicas como a própria mineração, poluição, criação de gado, monocultura e silvicultura que afetam a região desde antes do rompimento da barragem (SANTOS *et al.*, 2017; PINTO-COELHO, 2015; COELHO, 2006; OLIVEIRA & QUARESMA, 2017; DIAS *et*

al., 2018). No entanto, nossa hipótese não foi corroborada e as diferenças dos padrões de AFs entre comunidades analisadas foram explicadas pelo acaso.

Se a hipótese de que a assimetria flutuante é adequada para avaliar o impacto do rompimento for verdadeira, esse resultado pode indicar que as comunidades de anuros se recuperaram ao longo dos pouco mais de sete anos entre o desastre ambiental e a nossa amostragem. Essa hipótese é suportada pela recente descoberta de que a qualidade da água nas regiões agudamente afetadas pelo desastre voltou aos níveis pré-rompimento já no quarto ano após a descarga dos rejeitos na bacia do Rio Doce, com uma diferenciação entre ambientes lóticos e lênticos (WILD, 2024) e pela ausência de resposta em outros grupos de organismos analisados na região, diante de múltiplas questões avaliadas (PIVA, 2023; ETEROVICK, 2015; SILVA, 2020).

Alternativamente, múltiplos fatores não mensurados, tais como proximidade de áreas agrícolas, estradas e exposição a agrotóxicos, podem ter afetado nossos resultados, gerando a resposta observada. Sasaki *et al.* (2015) sugeriram que a combinação de alterações estruturais da paisagem, disponibilidade de recursos e microclimas causam um impacto maior sobre populações da herpetofauna do que a exposição a altas concentrações de metais em si, além de potencializarem os efeitos desses poluentes sobre os organismos. Apesar das lagoas do Santuário do Caraça estarem protegidas da maioria desses impactos, espera-se que sua biodiversidade seja mais rica do que a dos outros dois conjuntos de áreas analisadas, resultando em uma maior complexidade de relações ecológicas, incluindo competição e predação, que podem ser estressores dos girinos da região (STUMP, 2017). Por ser uma área de maior altitude, a RPPN Santuário do Caraça também apresenta maiores amplitudes térmicas (MOREIRA & PEREIRA 2004), o que pode causar maior estresse fisiológico nos girinos dessa região. Contudo, nós não mensuramos competição, predação, nem estresse fisiológico, o que nos impede de avaliar a relação entre essas variáveis e a AF das comunidades analisadas. É importante ressaltar que, embora as diferenças na AF das áreas AA e AP não tenham sido significativas, há uma chance de apenas 7% de que elas sejam explicadas pelo acaso, indicando que outros fatores não amostrados precisam ser melhor investigados.

Nós observamos um padrão idiossincrático nas respostas de assimetria flutuante das espécies, com algumas delas demonstrando um padrão esperado (IAF de AA>CA>AP) e outras seguindo o sentido contrário. Em se tratando de respostas específicas, vários estudos já demonstraram que diferentes espécies podem responder de forma distinta aos mesmos estímulos (LEDUC *et*

al., 2012; BARRANGUET *et al.*, 2002; OTERO *et al.*, 2018), devido às suas diferenças fisiológicas ou em razão de ocuparem diferentes micro-habitats, o que resulta em níveis de exposição distintos a um mesmo tipo de estressor. Cada espécie de girino ocupa um tipo de guilda ecomorfológica (ALTIG & JOHNSTON, 1989), incluindo espécies bentônicas, limnéticas, fossoriais e semi-terrestres, o que define suas interações com os diversos estressores ambientais ali presentes. Nos nossos resultados, apenas *S. fuscomarginatus* e *B. crepitans* apresentaram maior assimetria em áreas agudamente afetadas pela lama. Essas espécies são nectônicas e bentônicas, respectivamente (PEZZUTI, 2011), não formam cardumes e são vistas em ambientes abertos e em corpos hídricos temporários. No trabalho de (COSTA, SOLÉ & NOMURA, 2017), em ambientes usados para pastagens e agricultura, ou seja, ambientes muito impactados, os girinos de *S. fuscomarginatus* apresentam maiores níveis de AF no atributo relacionado à distância entre o focinho e a narina. Em ambientes com pouca vegetação nas margens dos lagos, os girinos tiveram maior AF em relação à distância dos olhos. Por estarem mais expostas à estressores ambientais, elas correm mais risco de predação, devido ao ambiente que se encontram. Espera-se por exemplo, que girinos bentônicos e fossoriais sejam mais afetados por poluentes depositados no fundo de uma lagoa do que os girinos que vivem na coluna d'água devido a exposições diferentes de partículas e metais (CROTEAU *et al.*, 2005), além da capacidade de depuração de cada porção do Rio Doce. Seguindo essa linha de pensamento, é possível que o efeito de metais e outros minerais contaminantes seja maior em algumas guildas de girinos se comparadas a outras, já que alguns dos microorganismos que compõe biofilmes possuem uma grande capacidade de mobilizar metais pesados (CROTEAU *et al.*, 2005). Em outros grupos de vertebrados, como as aves, há evidência de relação entre as guildas ocupadas pelas espécies e as respostas de cada uma delas a estressores ambientais. ANCIÃES & MARINI (2000) avaliaram os efeitos da fragmentação de florestas tropicais sobre a AF em comunidades de aves e encontraram uma resposta positiva somente nas espécies insetívoras.

Diante de respostas específicas ou até individuais de uma população em relação a assimetrias, nos questionamos qual seria o melhor modelo para explicar casos de assimetria flutuante onde só alguns atributos são assimétricos. Em (APARICIO, 2001; APARICIO & BONAL, 2002), foram encontradas respostas individuais sob a AF de algumas aves, concluindo que a susceptibilidade de um atributo está ligada às condições físicas de um indivíduo (p. ex., nutrição, crescimento), resultando em diferenças nos níveis de instabilidade no desenvolvimento.

Outras explicações alternativas para os nossos resultados podem estar associadas ao atributo analisado ou à nossa suposição quanto à veracidade da hipótese de assimetria flutuante. Devido à pequena grandeza das AFs, nas quais as diferenças de tamanho entre os lados geralmente são menores que 1%, é comum que ocorram erros de medidas em uma porção dos dados analisados (LENS *et al.*, 2002). Esses erros se manifestaram na baixa repetibilidade da maioria das medidas obtidas pelos dois medidores do trabalho. Como as medidas analisadas podem responder de forma distinta a diferentes pressões ambientais [p.ex., as narinas podem ter função de quimiorrecepção (FERRER & ZIMMER 2007) e reconhecimento de parentesco (WALDMAN, 1985), os olhos, com sua complexidade e especialização, são muito sensíveis a turbidez, um olho menor que outro pode estar relacionado também à evolução dos sistemas quimiorreceptores (PEZZUTI, 2011)]. Nós não podemos descartar a hipótese de que o atributo AOF não seja o mais adequado para avaliar o impacto persistente da contaminação de ambientes aquáticos causada pela descarga de lama da barragem do Fundão. A simetria do focinho, medida pela AOF, está associada com a hidrodinâmica do corpo dos girinos (GHODAGERI & PANCHARATNA, 2011), influenciando a eficiência individual no escape de predadores. Portanto, uma alta homeostase no desenvolvimento desse atributo deve ser adaptativa, prevenindo o surgimento de grandes assimetrias, mesmo em caso de exposição a estressores ambientais. Por fim, a hipótese da assimetria flutuante pode simplesmente não se aplicar ao nosso sistema de estudo. Diversos outros trabalhos como (LAUCK, 2006; EARL, 2010; LINS, 2013; PIUCO, 2013; FLOATE & FOX 2000; DOS REIS *et al.*, 2011; MENDES, 2014) avaliaram a AF de organismos entre áreas com diferentes níveis de impactos ambientais e não encontraram relação direta entre impacto e assimetria.

É importante pontuar que vários estudos demonstraram que há uma correlação entre instabilidade do desenvolvimento, avaliada pela assimetria flutuante, e concentrações de metais pesados em vários animais como peixes (HRENCHUK, 2007; MONNA *et al.*, 2011), anuros (ZHELEV *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2017) e mamíferos (NUNES *et al.*, 2001; SÁNCHEZ-CHARDI *et al.*, 2013). Apesar disso, essa correlação pode não ser significativa a depender da população testada e do atributo (HRENCHUK, 2007; GIROTTO *et al.*, 2020). É possível que o atributo em específico não seja diretamente impactado pelo desastre, mas que outros respondessem de forma esperada. Reis *et al.* (2024), mostraram que o rejeito do rompimento da barragem do Fundão está associado com diferenças em diferentes atributos de uma mesma população. Ao compararem a AF de populações de *Boa. albopunctata* amostradas antes e depois da descarga de sedimentos no Rio Doce, eles observaram que a AF de alguns atributos

se manteve estável, enquanto em outros houve uma diminuição após o contato com a lama. Já foi reportado na literatura que atributos que são importantes funcionalmente tendem a não apresentar assimetria flutuante, sofrendo pressão seletiva associada à manutenção da simetria (SOARES, 2023; ANCIAES & MARINI, 2000), como pode ser o caso da AOF. Todos os atributos escolhidos neste trabalho foram relacionados com órgãos do sentido (olho e narina), portanto várias especializações como morfologia, alimentação e comportamento (JITHIN *et al.*, 2022; KENTWOOD, 2007; MEIS, 1999), se perturbadas, podem gerar elevados níveis de assimetria, afetando a percepção do ambiente pelas larvas. Uma assimetria nos olhos, por exemplo, prejudicaria o direcionamento da natação, diminuindo assim o valor adaptativo e as chances sobrevivência dos indivíduos assimétricos. É possível que nosso atributo seja importante o suficiente para que haja correção das anomalias surgidas durante o desenvolvimento ontogenético, resultando em níveis de AF semelhantes entre áreas afetadas e preservadas.

Observando os padrões de riqueza, abundância e composições de espécies das comunidades aqui amostradas, notamos padrões muito distintos entre os pontos e, como esperado, as áreas preservadas foram mais ricas e as espécies foram relativamente mais abundantes. Também houve uma diferença na composição de espécies da área AP quando comparada com as áreas AA e CA. Dentro do universo dos 14 mil girinos coletados, ainda que tenhamos avaliado pouco mais de 10% dessa amostragem nas análises de AF, observamos alguns padrões que chamam a atenção por sugerirem alguma associação com o desastre. Algumas espécies parecem mais sensíveis a passagem do rejeito, como *Dendropsophus decipiens*, *D. minutus* e *S. fuscomarginatus* que ocorreram com menor frequência a abundância nas áreas AA. Além disso, *D. minutus* foi mais abundante nas lagoas da AP e rara na área AA. Também é notável que algumas espécies que ocorreram em Mariana nas áreas CA não ocorreram em áreas AA como *L. mystacinus* e *Phyl. burmeisteri*, sendo ainda mais surpreendente o caso das espécies que ocorreram tanto nas áreas AP quanto CA, mas não nas áreas AA como *Boa. polytaenia*, *Bok. aff. circumdata*, *Od. cultripes*, *Ol. longilinea* e *Scinax perereca*. As lagoas da área CA são mais parecidas com as da área AA do que com as da AP, tanto em termos da paisagem circundante quanto em relação aos parâmetros físico-químicos da água (Figuras S3 e S4 no Anexo), por isso nós hipotetizamos que a ausência dessas espécies na área AA pode indicar uma extinção local. Por outro lado, algumas espécies parecem ser mais tolerantes à presença do rejeito, sendo mais abundantes e frequentes em áreas AA, incluindo *Boa. faber*, *Boa. crepitans*, *Boa. semilineata*, *D. elegans* e *Scinax* sp. 23.

Dessa forma, é possível que, para algumas espécies, a resposta da assimetria flutuante seja distinta da resposta observada em escala de comunidade. Em outras palavras, a magnitude de variação na composição das espécies e das respostas à assimetria delas, nos impossibilitou encontrar diferenças marcantes a nível de comunidades. Por isso, sugerimos trabalhos de assimetria flutuante focados em população de espécies como *Phys. cuvieri* e *D. minutus*, que foram encontrados em todas as áreas da nossa amostragem e que apresentaram níveis de assimetria variáveis de acordo com o tipo de área. Com um enfoque a nível de populações, será possível encontrar respostas específicas e até mesmo aumentar as possibilidades de tipos de atributos a serem medidos, que foram limitados pela diversidade de formas encontradas. Por exemplo, alguns girinos como *E. ovalis*, não possuem narinas (PEZZUTI *et al.*, 2021), impedindo a obtenção dos atributos DNF e DON.

Como mencionado anteriormente, a variação sutil dos níveis de AF entre as comunidades analisadas foi explicada pelo acaso. Várias espécies apresentaram baixa abundância, o que pode ter influenciado a variância populacional. Não podemos descartar que os níveis de assimetria podem ter sido afetados por vieses amostrais associados às abundâncias das espécies, assim como a hipótese de que a contaminação pelo rejeito e os efeitos antrópicos encontrados em Mariana podem estar relacionados com uma menor abundância de algumas espécies.

Apesar de a maioria dos nossos resultados não terem suportado a hipótese da presença de impactos persistentes do rejeito do rompimento da barragem do Fundão, é indiscutível que esse desastre causou uma enorme catástrofe ambiental. O rejeito percorreu 600 quilômetros até o Oceano Atlântico, afetando os principais rios da Bacia, e como já citado, devastou fragmentos de Mata Atlântica, desequilibrou química e fisicamente os corpos d'água, fragmentou habitats e impactou toda a biodiversidade local. Como resultado, inúmeros trabalhos discutiram sobre os impactos pós-rompimento, mostrando impactos sobre fauna e flora bioindicadores (CESAR *et al.*, 2022, FIGUEIREDO *et al.*, 2024), hipertrofia hepática em uma espécie de anuro (REIS *et al.*, 2024), AF nas asas de artrópodes e assimetria direcional (derivada de AF) na mandíbula de outras espécies (SOARES, 2023).

Nosso estudo é importante por ser o primeiro que avaliou a ocorrência do efeito persistente da lama em comunidades de girinos. Embora a maioria dos nossos resultados contradizem a hipótese inicial, eles também fornecem algumas perspectivas e questões para novas pesquisas. Os resultados implicam que cada espécie apresenta sua variação em padrões de assimetria

flutuante, independente se foi encontrada em AA, AP ou CA; provavelmente existem respostas específicas que dão mais informações sobre o impacto do rompimento, mas é conclusivo que as espécies nas comunidades avaliadas respondem de maneiras muito independentes.

5- CONCLUSÃO

O seguinte trabalho fez um panorama a respeito da assimetria flutuante, ferramenta mede o estresse ambiental (DIDDE & RIVERA, 2019), predizendo o valor adaptativo dos indivíduos diante da instabilidade ambiental (DONGEN, 2006), em girinos de anuros nas lagoas da Bacia do Rio Doce que foram afetadas pelos rejeitos do rompimento da barragem do Fundão. Esperávamos encontrar maiores níveis de assimetria nas áreas onde a lama passou diretamente, por isso, selecionamos três tipos de áreas: duas afetadas pelos rejeitos e uma preservada, a RPPN Santuário do Caraça. Também esperávamos que os girinos das lagoas de Mariana, MG, epicentro do rompimento da barragem, seriam mais assimétricos se comparados aos girinos do Santuário do Caraça. Foram registradas 25 espécies dentre os 13.966 girinos coletados e seguindo nossas hipóteses, nós avaliamos quatro atributos, e aquele que apresentou maior repetibilidade foi a distância entre o olho-focinho (AOF) ($r= 0.9$). Com as variâncias homogêneas e os dados não normais, avaliamos o risco de assimetria direcional, que foi negativo. As diferenças foram explicadas pelo acaso ($p= 0.134$), confirmando a assimetria flutuante, mas nenhum indivíduo apresentou simetria bilateral perfeita. A sutil diferença entre as áreas AA e AP, mostra que as áreas afetadas obtiveram valores um pouco menores de AF em comparação com as lagoas da Serra do Caraça. Houve também um efeito marginal dos parâmetros ambientais sobre os valores médios das assimetrias flutuantes. Sobre os parâmetros físico-químicos, obtivemos que a altitude da Serra do Caraça é maior que as outras áreas, a turbidez, por sua vez, menor, enquanto as áreas AA tiveram maiores índices de condutividade elétrica. Sobre as variâncias dos índices de AF, não obtivemos correlação entre as espécies e as três áreas. No entanto, as espécies *Boana crepitans* e *Scinax fuscomarginatus*, foram concordantes com nossa hipótese, mostrando a possibilidade de futuras pesquisas com essas espécies. Nossa hipótese de que a assimetria flutuante é adequada para avaliar o impacto do rompimento não foi confirmada pois nosso resultado não abrangeu todos os impactos que a Bacia do Rio Doce já vem sofrendo há anos, o impacto humano, a monocultura e criação de gado, além de eventos naturais aleatórios que podem causar estresses que alteram resultados de estabilidade no desenvolvimento como a disponibilidade de recursos, exposição a poluentes e temperatura (SASAKI *et al.*, 2015). Apesar das lagoas do Santuário do Caraça estarem protegidas da maioria desses impactos, terem baixa turbidez e a Serra ter os maiores picos

climáticos da região, a diferença entre a AF das áreas AA e AP não foi significativa, indicando que mais fatores que não ficaram visíveis devem ser estudados.

Anexo

Tabela S1 – Dados dos pontos amostrais de cada área amostrada (AA, CA e AP). Os códigos das espécies são: 1 – Boana albopunctata; 2 – Boana crepitans; 3 – Boana faber; 4 – Boana polytaenia; 5 – Boana semilineata; 6 – Bokermannohyla aff. circumdata; 7 – Dendropsophus decipiens; 8 – Dendropsophus elegans; 9 – Dendropsophus minutus; 10 – Elachistocleis cesarii; 11 – Leptodactylus mystacinus; 12 – Odontophrynus cultripes; 13 – Physalaemus cuvieri; 14 – Physalaemus orophilus; 15 – Rhinella crucifer; 16 – Scinax curicica; 17 – Scinax eurydice; 18 – Scinax fuscomarginatus; 19 – Ololygon longilinea; 20 – Scinax perereca; 21 – Scinax squalirostris.

Área	Ponto amostral	Latitude	Longitude	Espécies
AA	AA01	-20.303414 S	-43.230425 W	8
	AA02	-20.304173 S	-43.245698 W	2, 8, 9,13
	AA03	-20.304890 S	-43.248856 W	8, 10, 13, 17
	AA04	-20.272835 S	-43.314783 W	2, 8
	AA05	-20.250931 S	-43.326076 W	2, 8, 17
	AA06	-20.238392 S	-43.418348 W	2, 5
	AA07	-20.300341 S	-43.250237 W	2, 8, 17
	AA08	-20.295852 S	-43.256809 W	1
	AA09	-20.274346 S	-43.185399 W	1, 5
	AA10	-20.294116 S	-43.258156 W	2, 3
	AA11	-20.268847 S	-43.301595 W	1, 2, 8
	AA12	-20.290859 S	-43.261762 W	2, 8, 17
	AA13	-20.298542 S	-43.212395 W	5, 18
AP	AP01	-20.110112 S	-43.491052 W	14, 16
	AP02	-20.101223 S	-43.486363 W	19
	AP03	-20.107536 S	-43.490363 W	13, 14, 16, 21
	AP04	-20.111380 S	-43.498790 W	9, 16
	AP05	-20.098823 S	-43.487663 W	6, 15
	AP06	-20.109246 S	-43.490479 W	9, 13, 16
	AP07	-20.098632 S	-43.499120 W	9, 15, 16
	AP08	-20.112477 S	-43.476527 W	9, 13, 14, 16, 21
	AP09	-20.106641 S	-43.477309 W	9, 14, 16
	AP10	-20.104097 S	-43.496488 W	14, 21
	AP11	-20.104470 S	-43.496547 W	4
	AP12	-20.113829 S	-43.475892 W	9, 16, 21
	AP13	-20.113036 S	-43.475452 W	9, 21
	AP14	-20.117922 S	-43.474908 W	9, 16, 21
	AP15	-20.122693 S	-43.472418 W	9, 13, 14, 16, 21
CA	CA01	-20.294167 S	-43.399317 W	2, 3, 7, 8, 13, 18
	CA02	-20.194864 S	-43.420513 W	8, 9, 13, 20
	CA03	-20.277170 S	-43.386444 W	1, 13
	CA04	-20.248900 S	-43.296177 W	8, 9, 17
	CA05	-20.320763 S	-43.308169 W	13
	CA06	-20.341785 S	-43.310964 W	8, 9, 17
	CA07	-20.309167 S	-43.338698 W	13, 18

CA08	-20.302874 S	-43.347456 W	1
CA09	-20.226995 S	-43.342873 W	8, 13, 20
CA10	-20.215491 S	-43.354288 W	8, 9, 20
CA11	-20.267607 S	-43.272027 W	7, 9
CA12	-20.303095 S	-43.316400 W	7, 9
CA13	-20.273253 S	-43.325493 W	2
CA14	-20.298897 S	-43.328588 W	7, 9, 20
CA15	-20.294815 S	-43.322995 W	12
CA16	-20.293941 S	-43.330636 W	7, 8, 13, 18
CA17	-20.318739 S	-43.372130 W	11

Tabela S2 – Vouchers do material utilizado de cada espécie e área para análises e N amostral.

Espécie	Área	Voucher (UFMG-G)	N
<i>Boana albopunctata</i>	AA	2851, 2893, 2894	14
	CA	2804, 2813	11
<i>Boana crepitans</i>	AA	2792, 2840, 2847, 2881, 2883, 2891, 2899, 2913, 2914	101
	CA	2807, 2917	13
<i>Boana faber</i>	AA	2882	11
	CA	2811	3
<i>Boana polytaenia</i>	AP	2987	15
<i>Boana semilineata</i>	AA	2788, 2850, 2852	60
<i>Bokermannohyla</i> aff. <i>circumdata</i>	AP	3003	5
<i>Dendropsophus decipiens</i>	CA	2796, 2809, 2866, 2909, 2921	61
<i>Dendropsophus elegans</i>	AA	2836, 2843, 2849, 2862, 2877, 2884, 2888, 2896, 2915	148
	CA	2775, 2797, 2812, 2820, 2826, 2901	86
<i>Dendropsophus minutus</i>	AA	2842	4
	CA	2774, 2783, 2827, 2867, 2900, 2908, 2920	97
	AP	2933, 2944, 2952, 2966, 2969, 2977, 2997, 3008, 3013	146
<i>Elachistocleis cesarii</i>	AA	2859	11
<i>Leptodactylus mystacinus</i>	CA	2803	9
<i>Odontophrynus cultripes</i>	CA	2795	11
<i>Physalaemus cuvieri</i>	AA	2841, 2863	19
	CA	2780, 2782, 2801, 2808, 2814, 2821, 2927	64
	AP	2947, 2979, 3010, 3022	42
<i>Physalaemus orophilus</i>	AP	2934, 2941, 2980, 2991, 3009, 3021, 3023	123
<i>Rhinella crucifer</i>	AP	2968, 2999	47
<i>Scinax curucica</i>	AP	2929, 2930, 2939, 2943, 2945, 2950, 2951, 2963, 2965, 2970, 2971, 2976, 2978, 2993, 2996, 3006, 3007, 3018	273
<i>Scinax eurydice</i>	AA	2846, 2860, 2878, 2890	63
	CA	2778, 2902	38
<i>Scinax fuscomarginatus</i>	AA	2854	19
	CA	2798, 2810, 2924	31
<i>Oloolygon longilinea</i>	AP	2981	30
<i>Scinax perereca</i>	CA	2786, 2822, 2829, 2919	28
<i>Scinax squalirostris</i>	AP	2964, 2975, 2989, 2992, 3005, 3012, 3019	105

Tabela S3 – Dados ambientais, aferidos de cada ponto amostral, utilizados para criação da variável ambiental. Alt= altitude; T = temperatura em °C; CE = condutividade elétrica em $\mu\text{S}/\text{cm}$; OD = oxigênio dissolvido em mg/L; TU = turbidez em μTU .

Ponto amostral	Alt	pH	T	CE	OD	TU
AA01	534	6.65	22.9	50.4	10.2	18.68

AA02	538	6.66	23	29.12	8.4	18.26
AA03	539	6.37	23.9	89.1	4.8	42.1
AA04	585	5.5	27.3	15.65	4.5	23.2
AA05	591	6.11	32.3	28.61	4.9	65.4
AA06	704	6.7	20.2	52.6	6	56.9
AA07	541	6.77	22.8	20.42	5.4	33
AA08	555	6.06	26.6	38.6	0.9	6.78
AA09	611	5.94	23.9	48.4	7.3	25.5
AA10	549	7.15	35.9	96.3	3.3	30.3
AA11	578	5.86	24.5	33.6	2.9	8.35
AA12	550	6.58	31.4	32.5	5.7	20.6
AA13	521	6.34	23.7	38.7	7.2	87.2
AP01	1266	5	18.8	6.72	3.3	3.1
AP02	1260	6.3	20.3	53.2	4.8	4.27
AP03	1265	4.77	28.7	8.35	5.6	0
AP04	1337	4.84	22.2	6.69	6.3	0.49
AP05	1285	6.27	23.2	60.3	7.4	11.7
AP06	1263	4.32	26.5	4.35	4.8	2.86
AP07	1310	4.63	22.4	4.04	6.9	0.42
AP08	1256	4.31	21.3	7.34	1.8	1.87
AP09	1258	6.95	22.2	4.97	6.8	0.12
AP10	1273	4.38	22.9	12.5	4.4	2.1
AP11	1273	5.02	30.9	7.25	7.1	0
AP12	1257	4.81	25.7	6.86	7.1	0.76
AP13	1260	4.16	23.6	31	3.5	0
AP14	1258	5.23	28.7	3.47	7.7	1.39
AP15	1261	5.38	20.5	7.78	5.7	0
CA01	784	6.38	20.8	41.9	5	46.1
CA02	836	6.05	19.7	11.09	8.9	4.37
CA03	799	6.13	21.6	10.14	6.3	69.1
CA04	644	6.37	31.5	25.5	96	4.56
CA05	692	6.22	20.2	13.6	5.1	10.96
CA06	675	5.63	19.5	2.13	8.2	8.24
CA07	706	5.37	26.9	17.1	3.7	3.96
CA08	705	6.63	21.5	15	8.1	14.18
CA09	735	6.41	22.3	15.01	6.3	39.8
CA10	811	6.33	22	9.39	6.3	3.58
CA11	688	6.24	25.9	12.76	3.5	1.43
CA12	675	5.24	24	16.23	5	21.2
CA13	597	7.4	22.7	18.59	6	10.4
CA14	676	5.18	24.4	3.18	1.3	47.1
CA15	685	6.51	21.1	14.71	9	6.1
CA16	676	6.44	21.6	23	3.4	7.62
CA17	802	5.25	21	4.2	2.9	51.4

Tabela S4 – Resultados das regressões entre os valores da diferença entre os lados direito e esquerdo aferidos pelos dois medidores. Estão assinalados com * os valores com r acima de 0.7, considerados altos o suficiente para que erros de medição possam ser considerados negligenciáveis.

Medida	Vista	R ²
AOF	Dorsal	0.811*
	Lateral	0.130
DNF	Dorsal	0.140
	Lateral	0.094
AON	Dorsal	0.314
	Lateral	0.091
DO	Dorsal	0.114
	Lateral	0.014

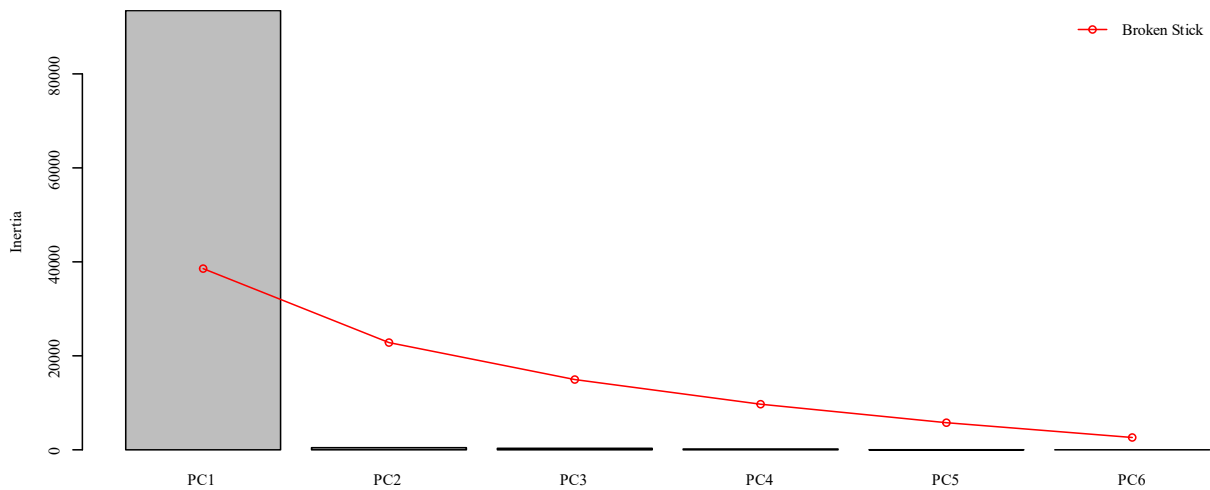


Figura S1 – Screenplot da PCA feita com os parâmetros ambientais coletados.

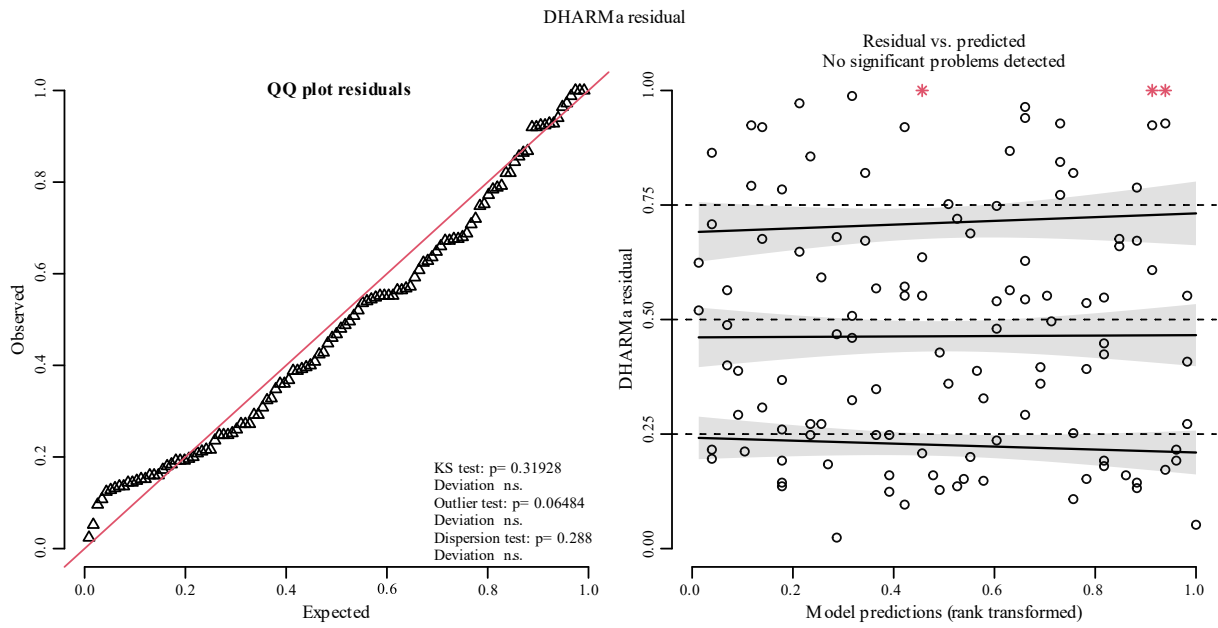


Figura S2 – Ajuste dos resíduos do modelo.

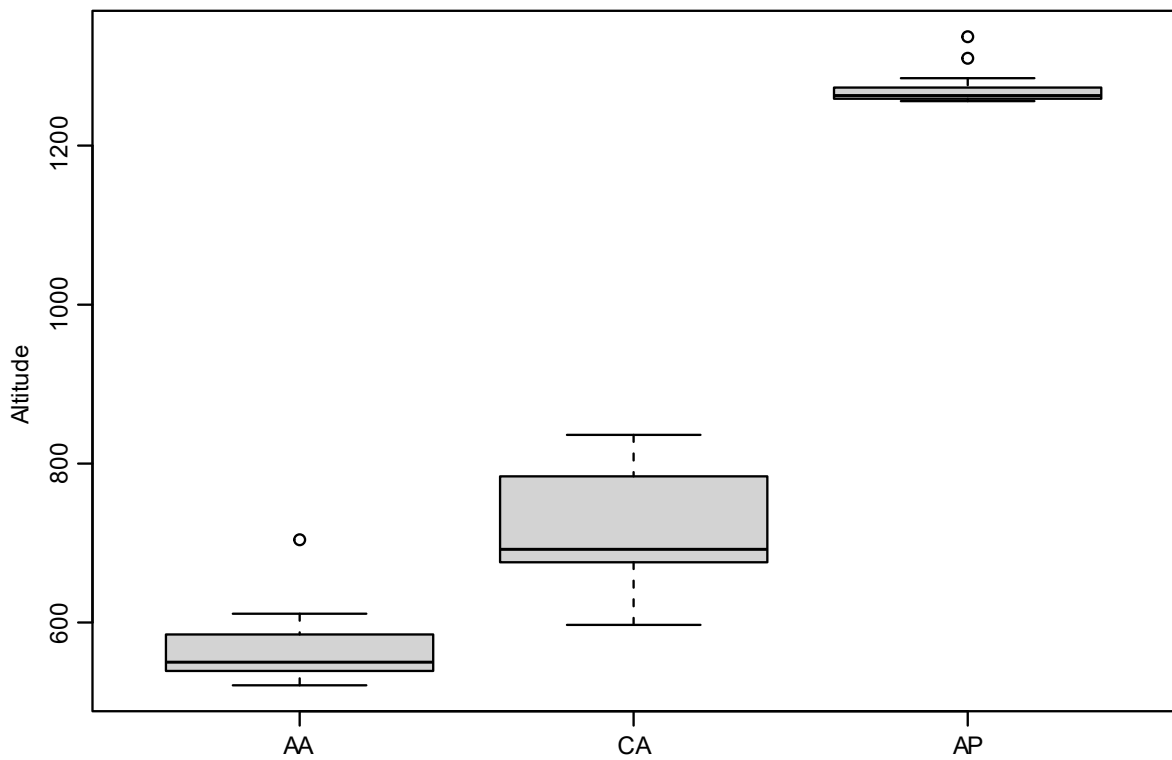


Figura S3 – Gráfico boxplot da altitude por tipo de área. AA = Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas.

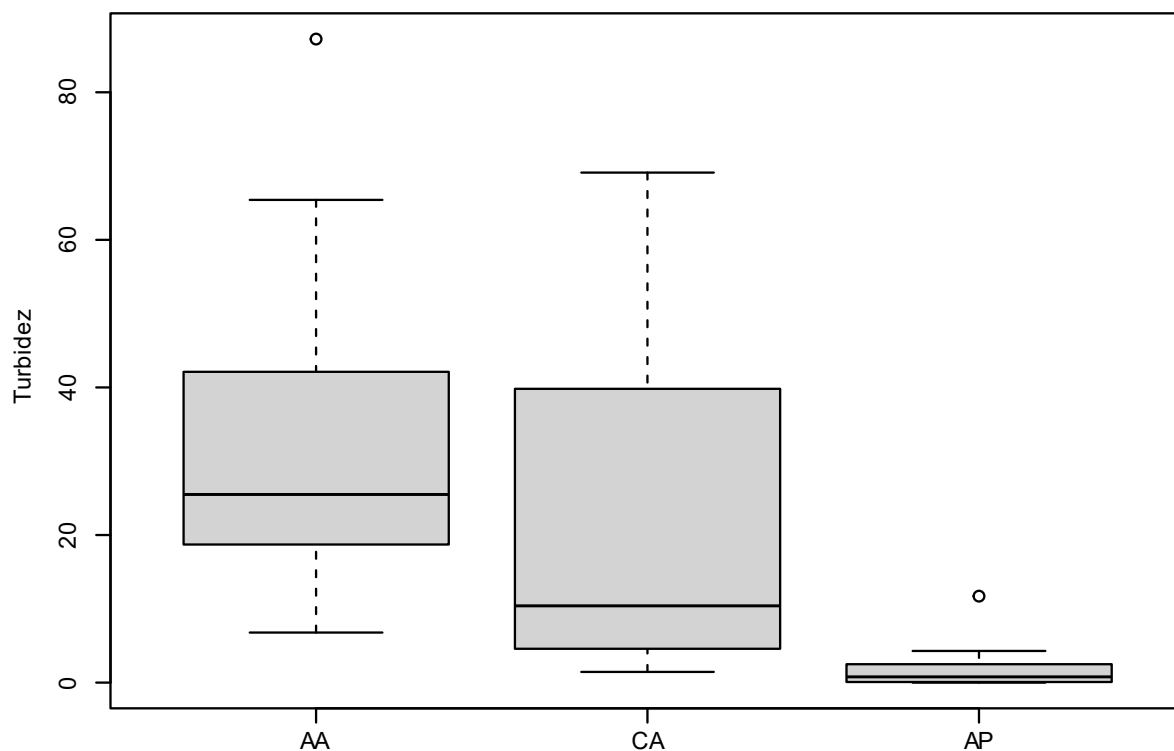


Figura S4 – Gráfico boxplot do índice da turbidez por tipo de área. AA= Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas.

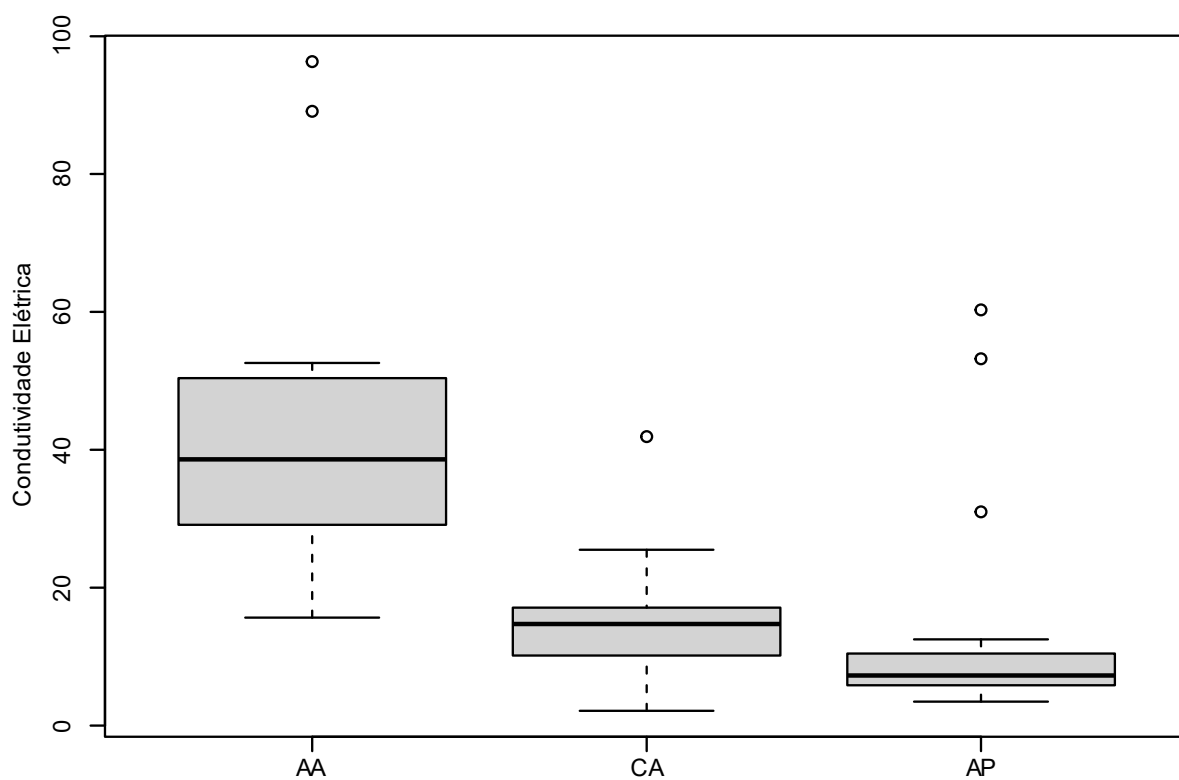


Figura S5 – Gráfico boxplot da condutividade elétrica por cada tipo de área. AA= Áreas Agudamente Afetadas AP = Áreas Preservadas e CA = Áreas Cronicamente Afetadas

6- REFERÊNCIAS

ANA (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS). **Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce: Rompimento da Barragem em Mariana/MG.** Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil—Informe 2015, p. 50, 2016.

ALLENTOFT, M. E.; O'BRIEN, J. **Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review.** *Diversity*, v. 2, n. 1, p. 47-71, 2010.

ALMEIDA, C. A. *et al.* **Characterization and evaluation of sorption potential of the iron mine waste after Samarco dam disaster in Doce River basin—Brazil.** *Chemosphere*, v. 209, p. 411-420, 2018.

ALTIG, R.; JOHNSTON, G. F. **Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats.** *Herpetological monographs*, p. 81-109, 1989.

AMIARD-TRIQUET, C. **Pollution tolerance in aquatic animals: From fundamental biological mechanisms to ecological consequences.** In: *Ecotoxicology*. Elsevier, p. 33-91, 2019.

ANCIAES, M.; MARINI, M. A. **The effects of fragmentation on fluctuating asymmetry in passerine birds of Brazilian tropical forests.** *Journal of Applied Ecology*, v. 37, n. 6, p. 1013-1028, 2000.

APARICIO, J. M. **Patterns of growth and fluctuating asymmetry: the effects of asymmetrical investment in traits with determinate growth.** *Behavioral ecology and sociobiology*, v. 49, p. 273-282, 2001.

APARICIO, J. M.; BONAL, R. **Why do some traits show higher fluctuating asymmetry than others? A test of hypotheses with tail feathers of birds.** *Heredity*, v. 89, n. 2, p. 139-144, 2002.

ARAÚJO-VIEIRA, K. *et al.* **Treefrog diversity in the Neotropics: Phylogenetic relationships of Scinaxini (Anura: Hylidae: Hylinae).** *South American Journal of Herpetology*, v. 27, n. sp1, p. 1-143, 2023.

ATAÍDES, A. G. *et al.* **Avaliação da influência de fatores hidroclimáticos sobre a estrutura populacional de Podocnemis expansa (Testudines: Podocnemididae) no Rio Formoso, sudeste da Amazônia brasileira.** Iheringia. Série Zoologia, v. 111, p. e2021021, 2021.

BANDINI, B. *et al.* **Desastre ambiental da Barragem de Fundão, MG-Análise de impactos socioambientais.** Revista Internacional de Ciências, v. 09, n. 03, p. 2 - 15, 2019.

BARRANGUET, C. *et al.* **Development of photosynthetic biofilms affected by dissolved and sorbed copper in a eutrophic river.** Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, v. 21, n. 9, p. 1955-1965, 2002.

BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. J. **The complexity of deformed amphibians.** Frontiers in Ecology and the Environment, v. 1, n. 2, p. 87-94, 2003.

BRANDT, S. A. **Classification of geomorphological effects downstream of dams.** Catena, v. 40, n. 4, p. 375-401, 2000.

BUCH, A. C. *et al.* **Ecotoxicological assessment after the world's largest tailing dam collapse (Fundão dam, Mariana, Brazil): effects on oribatid mites.** Environmental Geochemistry and Health, v. 42, p. 3575-3595, 2020.

BURLIBAŞA, L.; GAVRILĂ, L. **Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity.** Applied Ecology and Environmental Research, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2011.

CARMO, F. F.; LANCHOTTI, A. O.; KAMINO, L. H. Y. **Mining waste challenges: environmental risks of gigatons of mud, dust and sediment in megadiverse regions in Brazil.** Sustainability, v. 12, n. 20, p. 8466, 2020.

CARVALHO, G. B. **Incidências de impactos decorrentes de acidentes com barragens de rejeito.** Dissertação de Mestrado – Escola de Minas, Núcleo de Geotecnia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 2018.

CESAR, R. G. *et al.* **Poluição por metais pesados em depósitos fluviais impactados pelo rompimento de barragem de mineração na Bacia do Rio Doce (MG): minhocas como bioindicadores.** Revista Brasileira de Geografia Física, v. 15, n. 1, p. 414-428, 2022.

CFBio (CONSELHO FEDERAL DE BIOLOGIA). **Resolução nº 301, de 8 de dezembro de 2012. Dispõe sobre os procedimentos de captura, contenção, marcação, soltura e coleta de animais vertebrados in situ e ex situ, e dá outras providências.** Brasília/DF, 8 de dezembro de 2012. Disponível em: https://www.crbio01.gov.br/media/view/2016/06/resolu_o_cfbio_n_2012-301_sobre_captura_de_vertebrados_362.pdf . Acesso em: 16 de abril de 2024.

CHERNOVA, E. N.; LYSENKO, E. V. **The content of metals in organisms of various trophic levels in freshwater and brackish lakes on the coast of the Sea of Japan.** Environmental Science and Pollution Research, v. 26, p. 20428-20438, 2019.

CIVITELLO, D. J. *et al.* **Biodiversity inhibits parasites: broad evidence for the dilution effect.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, n. 28, p. 8667-8671, 2015.

COELHO, A. L. N. **Situação hídrico-geomorfológica da bacia do rio Doce com base nos dados da série histórica de vazões da estação de Colatina – ES.** Caminhos de Geografia, Uberlândia, v. 6, n. 19, p. 56-79, 2006.

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

COELHO, A. L. N. **Bacia hidrográfica do Rio Doce (MG/ES): uma análise socioambiental integrada.** Geografares, n. 7, 2009.

COOKE, A. S. **Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field.** Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, v. 25, n. 2, p. 123-133, 1981.

COSTA, R. N.; NOMURA, F. **Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole.** Hydrobiologia, v. 765, p. 85-96, 2016.

COSTA, R. N.; SOLÉ, M.; NOMURA, F. **Agropastoral activities increase fluctuating asymmetry in tadpoles of two neotropical anuran species.** Austral ecology, v. 42, n. 7, p. 801-809, 2017.

CROTEAU, M. N.; LUOMA, S. N.; STEWART, A. R. **Trophic transfer of metals along freshwater food webs: evidence of cadmium biomagnification in nature.** *Limnology and Oceanography*, v. 50, n. 5, p. 1511-1519, 2005.

CRUZ-SANTIAGO, O. *et al.* **Levels of persistent organic pollutants in cane toads (*Rhinella marina*) differ among sites with varying industrial and agricultural activities.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 103, p. 104280, 2023.

DA MARTINS, C. A. *et al.* **A dinâmica de metais-traço no solo.** *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 17, n. 3, p. 383-391, 2011.

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

DA SILVA CRUZ, F. V. *et al.* **Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest?.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 189, p. 110021, 2020.

DE CARVALHO AGUIAR, V. M. *et al.* **Bioavailability and ecological risks of trace metals in bottom sediments from Doce river continental shelf before and after the biggest environmental disaster in Brazil: the collapse of the Fundão dam.** *Journal of Environmental Management*, v. 272, p. 111086, 2020.

DE SOUZA, A. C. *et al.* **Low levels of persistent organic pollutants in sediments of the Doce River mouth, South Atlantic, before the Fundão dam failure.** *Science of the Total Environment*, v. 802, p. 149882, 2022.

DIAS, C. A. *et al.* **Impactos do rompimento da barragem de Mariana na qualidade da água do rio Doce.** *Revista Espinhaço*, v.7, n. 1, p. 21-35, 2018.

DIDDE, R. D.; RIVERA, G. **Patterns of fluctuating asymmetry in the limbs of anurans.** *Journal of morphology*, v. 280, n. 4, p. 587-592, 2019.

DING, G. H. *et al.* **Comprehensive assessment of the ecological risk of exposure to triphenyl phosphate in a bioindicator tadpole.** *Chemosphere*, v. 308, p. 136242, 2022.

DODD JR, C. K. **The effects of drought on population structure, activity, and orientation of toads (*Bufo quercicus* and *B. terrestris*) at a temporary pond.** *Ethology ecology & evolution*, v. 6, n. 3, p. 331-319, 1994.

DONGEN, S. V. **Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future.** *Journal of evolutionary biology*, v. 19, n. 6, p. 1727-1743, 2006.

DORMANN, C. F. *et al.* **Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance.** *Ecography*, v. 36, n. 1, p. 27-46, 2013.

DOS REIS, E. F. *et al.* **Efeito da integridade ambiental sobre a Assimetria Flutuante em *Erythrodiplax basalis* (Libellulidae: Odonata) (Kirby).** *EntomoBrasilis*, v. 4, n. 3, p. 103-107, 2011.

DUTRA, P. R. F. **Análise dos impactos relacionados ao rompimento da barragem de Fundão em Mariana/MG com ênfase em recursos hídricos.** Monografia (Especialização em Gerenciamento de Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2018.

EARL, J. E.; WHITEMAN, H. H. **Evaluation of phosphate toxicity in Cope's Gray Treefrog (*Hyla chrysoscelis*) tadpoles.** *Journal of Herpetology*, v. 44, n. 2, p. 201-208, 2010.

ESPINDOLA, H. S. *et al.* **Desastre da Samarco no Brasil: desafios para a conservação da biodiversidade.** *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, v. 5, n. 3, p. 72-100, 2016.

ESTES, E. C. J.; KATHOLI, C. R.; ANGUS, R. A. **Elevated fluctuating asymmetry in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a river receiving paper mill effluent.** *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 25, n. 4, p. 1026-1033, 2006.

ETEROVICK, P. C. *et al.* **Testing the relationship between human occupancy in the landscape and tadpole developmental stress.** *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0120172, 2015.

FERNANDES, G. W. *et al.* **Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil.** *Natureza & Conservação*, v. 14, n. 2, p. 35-45, 2016.

FERRER, R. P.; ZIMMER, R. K. **The scent of danger: arginine as an olfactory cue of reduced predation risk.** *Journal of Experimental Biology*, v. 210, n. 10, p. 1768-1775, 2007.

FIGUEIREDO, J. C. G. *et al.* **Reference sites of threatened riverine Atlantic Forest in upper Rio Doce watershed.** *Nature Conservation Research*, v. 9, p. ncr.2024.006, 2024.

FLOATE, K. D.; FOX, A. S. **Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality.** *Ecological Applications*, v. 10, n. 5, p. 1541-1550, 2000.

FOX, J; WEISBERG, S. **An {R} Companion to Applied Regression**, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage publications. 2019.

GHODAGERI, M. G.; PANCHARATNA, K. **Morphological and behavioral alterations induced by endocrine disrupters in amphibian tadpoles.** *Toxicological & Environmental Chemistry*, v. 93, n. 10, p. 2012-2021, 2011.

GIROTTO, L. *et al.* **Acute and chronic effects on tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to mining tailings from the dam rupture in Mariana, MG (Brazil).** *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 231, p. 1-15, 2020.

GLÜCKSMANN, A. **Development and differentiation of the tadpole eye.** *The British journal of ophthalmology*, v. 24, n. 4, p. 153, 1940.

GOMEZ-MESTRE, I.; KULKARNI, S.; BUCHHOLZ, D. R. **Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying.** *PloS one*, v. 8, n. 12, p. e84266, 2013.

GOSNER, K. L. **A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification.** *Herpetologica*, v. 16, p. 183–190, 1960.

GRAHAM, J. H. *et al.* **Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications.** *Symmetry*, v. 2, n. 2, p. 466-540, 2010.

GROSS, J.; LIGGES, U. **nortest: Tests for Normality**. R package version, v. 1, n. 4, 2015.

GUO, R. *et al.* **Fluctuating asymmetry rather than oxidative stress in *Bufo raddei* can be an accurate indicator of environmental pollution induced by heavy metals**. Environmental monitoring and assessment, v. 189, p. 1-10, 2017.

HARTIG, F.; HARTIG, M. F. **Package ‘DHARMA’**. R Package. R-project. org/package=DHARMa, 2022.

HAYWOOD, L. K. *et al.* **Xenopus laevis embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium**. African Zoology, v. 39, n. 2, p. 163-174, 2004.

HENRIQUES, N. R.; CORNELISSEN, T. **Wing asymmetry of a butterfly community: is altitude a source of stress?** Community Ecology, v. 20, p. 252-257, 2019.

HERVÉ M. R. **VAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics**. R package version 0.9-81-2, 2022.

HOPKINS, W. A. **Amphibians as models for studying environmental change**. ILAR journal, v. 48, n. 3, p. 270-277, 2007.

HORA, A. M.; DIAS, C. A.; GUEDES, G. R. **Bacia Hidrográfica do Rio Doce: do processo de territorialização à atual importância econômica no cenário estadual**. Revista Econ Pol Hist Econ, v. 9, p. 5-36, 2013.

HRENCHUK, L. **Fluctuating Asymmetry in the Slimy Sculpin, *Cottus Cognatus*, Upstream and Downstream of Two Mine-sites in the Northwest Territories**. 2007. Doctoral dissertation – Department of Biology, University of Winnipeg, 2007.

IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais**. Brasília, DF, 2015.

IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Portaria Nº 32-N, 30 de março de 1994. Ato legal de criação da RPPN Santuário do Caraça**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano 131, n.

62, 4 de abril de 1994. Disponível em: https://sistemas.icmbio.gov.br/site_media/portarias/2014/08/01/portaria_-_rppn_santu%C3%A1rio_cara%C3%A7a.pdf . Acesso em: 16 de abril de 2024.

INTAMAT, S. *et al.* **Heavy metal accumulation in aquatic animals around the gold mine area of Loei province, Thailand.** Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, v. 22, n. 6, p. 1418-1432, 2016.

IVANOV, V. P. *et al.* **Application of fluctuating asymmetry indexes of silver birch leaves for diagnostics of plant communities under technogenic pollution.** Russian journal of plant physiology, v. 62, p. 340-348, 2015.

JACKSON, D. A. **Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristic and statistical approaches.** Ecology, v. 74, n. 8, p. 2204-2214, 1993.

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

JARA, F. G. *et al.* **Warming-induced shifts in amphibian phenology and behavior lead to altered predator-prey dynamics.** Oecologia, v. 189, p. 803-813, 2019.

JITHIN, V.; JOHNSON, J. A.; DAS, A. **Influence of check dams on the activity pattern and morphometric traits of overwintering tadpoles in the Western Himalaya.** Limnologica, v. 95, p. 125992, 2022.

JUNCÁ, F. A. *et al.* **Girinos como bioindicadores da qualidade da água do Rio Doce.** Relatório Final Greenpeace, 2017.

KENTWOOD, D. W. **The ecology and behavior of amphibians.** University of Chicago Press, 2007.

KOSSOFF, D. *et al.* **Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation.** Applied Geochemistry, v. 51, p. 229-245, 2014.

- LACAZ, F. A. C.; PORTO, M. F. S.; PINHEIRO, T. M. M. **Tragédias brasileiras contemporâneas: o caso do rompimento da barragem de rejeitos de Fundão/Samarco.** Revista brasileira de saúde ocupacional, v. 42, p. e9, 2017.
- LAVILLA, E. O.; SCROCCHI, G. J. **Morfometria larval de los generos de Telamatobinae (Anura: Leptodactylidae) de Argentina Y Chile.** Physis v. 44, p. 39–43, 1986.
- LAUCK, B. **Fluctuating asymmetry of the frog *Crinia signifera* in response to logging.** Wildlife Research, v. 33, n. 4, p. 313-320, 2006.
- LEAL, J. S. *et al.* **Effects of mine tailings on aquatic macroinvertebrate structure within the first year after a major dam collapse.** Marine and Freshwater Research, v. 74, n. 18, p. 1506-1518, 2023.
- LEÃO, R.; RABELO, R. **A extensão da cadeia produtiva da economia mineral no PIB brasileiro.** Texto para Discussão, 2023.
- LEDUC, J. C. *et al.* **Ecology of herpetofaunal populations in smelting tailings wetlands.** Herpetology Notes, v. 5, p. 115-125, 2012.
- LEFCORT, H. *et al.* **Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 35, p. 447-456, 1998.
- LENS, L. U. C. *et al.* **Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies?.** Biological reviews, v. 77, n. 1, p. 27-38, 2002.
- LI, D. *et al.* **phyr: An r package for phylogenetic species-distribution modelling in ecological communities.** Methods in Ecology and Evolution, v. 11, n. 11, p. 1455-1463, 2020.
- LINS, A. C. R. **Condição corporal e assimetria flutuante de lagartos em áreas de Cerrado contínuas e fragmentadas na UHE Serra da Mesa, Minaçu, GO.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Fundação Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2013.
- LOPES, L. M. N. **O rompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais.** Sinapse Múltipla, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2016.

LOTTERMOSER, B. G. **Mine Wastes: Characterization, Treatment and Environmental Impacts**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003, ISBN: 3-540-00526-9 (277 pp., Hardback) 2006.

LYRA, M. L.; HADDAD, C. F. B.; DE AZEREDO-ESPIN, A. M. L. **Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers**. *Molecular Ecology Resources*, v. 17, n. 5, p. 966-980, 2017.

MANZINI, I.; SCHILD, D. **Classes and narrowing selectivity of olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles**. *The Journal of general physiology*, v. 123, n. 2, p. 99-107, 2004.

MARTINHO, B.; LOPES, I.; COELHO, S. D. **Revisão sobre a avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais em linhas celulares de anfíbios**. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*, v. 11, p. 4-4, 2022.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. **Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo**. *Estudos avançados*, v. 24, p. 209-220, 2010.

MEIS, N. J. **The effects of mining effluent on amphibian breeding behavior and survival**. Thesis (Bachelor's Degree) - Department of Natural Sciences at Carroll College, Helena, Montana, 1999.

MENDES, G. M. **Assimetria Flutuante como bioindicadora de mudanças ambientais e interações tróficas em *Cecropia pachystachya* (Urticaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2014.

MØLLER, A. P.; SWADDLE, J. P. **Asymmetry, developmental stability and evolution**. Oxford University Press, UK, 1997.

MØLLER, A. P.; MANNING, J. **Growth and developmental instability**. *The Veterinary Journal*, v. 166, n. 1, p. 19-27, 2003.

MONNA, F. *et al.* **Wild brown trout affected by historical mining in the Cévennes National Park, France**. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 16, p. 6823-6830, 2011.

MOREIRA, A. A. M.; PEREIRA, C. C. A. **Levantamento topoclimático da RPPN Santuário do Caraça.** Caderno de Geografia, v. 14, n. 23, p. 43-50, 2004.

NUNES, A. C.; DA LUZ MATHIAS, M.; CRESPO, A. M. **Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals.** Environmental pollution, v. 113, n. 1, p. 87-93, 2001.

OEHRIG, J. *et al.* **Applying multivariate techniques to fingerprint water quality impact of the Fundão Dam breach within the Rio Doce basin.** Integrated Environmental Assessment and Management, v. 20, n. 1, p. 133-147, 2024.

OKSANEN, J. *et al.* **Package ‘vegan’. Community ecology package, version,** v. 2, n. 3, 2018.

OLIVEIRA, C. M. **Responsabilidade civil ambiental e a mineração no brasil: análise da necessidade de proteção ambiental, reinvenção das atividades econômicas e o eventual paradoxo com a atividade minerária.** Revista de Direito Ambiental e Socioambientalismo, v. 5, n. 2, p. 36-54, 2019.

OLIVEIRA, K. S. S.; DA SILVA QUARESMA, V. **Temporal variability in the suspended sediment load and streamflow of the Doce River.** Journal of South American Earth Sciences, v. 78, p. 101-115, 2017.

OMACHI, C. Y. *et al.* **Atlantic Forest loss caused by the world’s largest tailing dam collapse (Fundão Dam, Mariana, Brazil).** Remote Sensing Applications: Society and Environment, v. 12, p. 30-34, 2018.

OTERO, M. A. *et al.* **Differential effects on life history traits and body size of two anuran species inhabiting an environment related to fluorite mine.** Ecological indicators, v. 93, p. 36-44, 2018.

PALMER, A. R.; STROBECK, C. **Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns.** Annual review of Ecology and Systematics, v. 17, n. 1, p. 391-421, 1986.

PALMER, A. R. **Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Developmental instability: its origins and evolutionary implications: proceedings of the international**

conference on developmental instability: its origins and evolutionary implications, Tempe, Arizona, 14–15 June 1993. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 335-364.

PARADIS, E.; SCHLIEP, K. **ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R**. *Bioinformatics*, v. 35, n. 3, p. 526-528, 2019.

PATAR, A. *et al.* **Cadmium pollution and amphibians—Studies in tadpoles of *Rana limnocharis***. *Chemosphere*, v. 144, p. 1043-1049, 2016.

PEZZUTI, T. L. *et al.* **The tadpoles of the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil: a baseline for larval knowledge and anuran conservation in a diverse and threatened region**. *South American Journal of Herpetology*, v. 22, n. sp1, p. 1-107, 2021.

PIGNATARO, T. *et al.* **Wings are not perfect: increased wing asymmetry in a tropical butterfly as a response to forest fragmentation**. *The Science of Nature*, v. 110, n. 4, p. 28, 2023.

PINHEIRO, T. M. M. **Tragédias brasileiras contemporâneas: o caso do rompimento da barragem de rejeitos de Fundão/Samarco**. *Revista brasileira de saúde ocupacional*, v. 42, p. e9, 2017.

PINTO-COELHO, R. M. **Existe governança das águas no Brasil? Estudo de caso: O rompimento da Barragem de Fundão, Mariana (MG)**. *Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG*, v. 24, n. 1-2, 2015.

PIUCO, R. C. **Flutuação populacional, variação morfométrica e assimetria flutuante em *Pygoscelis papua*, no arquipélago das Shetlands do Sul, Antártica**. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, 2013.

PIVA, G. C. **Efeitos crônicos do rompimento da barragem “Fundão” sobre a fauna de artrópodes na bacia do Rio Gualaxo do Norte, Mariana, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal De Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2023.

PORTIK, D. M.; STREICHER, J. W.; WIENS, J. J. **Frog phylogeny: a time-calibrated, species-level tree based on hundreds of loci and 5,242 species**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 188, p. 107907, 2023.

QURESHI, I. Z. *et al.* **Assessment of heavy metals and metalloids in tissues of two frog species: *Rana tigrina* and *Euphlyctis cyanophlyctis* from industrial city Sialkot, Pakistan.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 14157-14168, 2015.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022.

REIS, J. C.; COSTA, R. N.; NALI, R. C. **Differences in fluctuating asymmetry and liver mass in a population of amphibians affected by the rupture of the Fundão dam, the largest environmental disaster in Brazil.** *Hydrobiologia*, p. 1-14, 2024.

ROHLF, F. J. **tpsUtil, file utility program. version 1.82.** Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2023a.

ROHLF, F. J. **tpsDig, digitize landmarks and outlines, Version 2.32.** Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2023b.

RUDORFF, N. *et al.* **Remote sensing monitoring of the impact of a major mining wastewater disaster on the turbidity of the Doce River plume off the eastern Brazilian coast.** *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, v. 145, p. 349-361, 2018.

SAIDON, N. B. *et al.* **Trophic transfer and biomagnification potential of environmental contaminants (heavy metals) in aquatic ecosystems.** *Environmental pollution*, v. 340, p. 122815, 2024.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** CSH Laboratory Press, 2001.

SÁNCHEZ-CHARDI, A.; GARCÍA-PANDO, M.; LÓPEZ-FUSTER, M. J. **Chronic exposure to environmental stressors induces fluctuating asymmetry in shrews inhabiting protected Mediterranean sites.** *Chemosphere*, v. 93, n. 6, p. 916-923, 2013.

SANSEVERINO, A. M.; MESSIMIAN, J. L. **Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais.** *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 4, 2008.

SANTANA, F. C. *et al.* **Water quality of the Gualaxo do Norte and Carmo rivers after the Fundão dam collapse, Mariana, MG.** *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 232, p. 1-13, 2021.

SANTOS, J. P. *et al.* **Susceptibilidade à erosão no Rio Gualaxo do Norte-MG.** *Caminhos de Geografia*, v. 18, n. 63, 286–307, 2017.

SANTOS JUNIOR, J. E.; SANTOS, F. R.; SILVEIRA, F. A. **Hitting an unintended target: Phylogeography of *Bombus brasiliensis* Lepeletier, 1836 and the first new Brazilian bumblebee species in a century (Hymenoptera: Apidae).** *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0125847, 2015.

SASAKI, K. *et al.* **Mining-caused changes to habitat structure affect amphibian and reptile population ecology more than metal pollution.** *Ecological Applications*, v. 25, n. 8, p. 2240-2254, 2015.

SCHACHT, M. C.; MCBRAYER, L. D. **A method for constructing an adjustable platform to obtain lateral photographs of larval anurans.** *Herpetological review*, v. 40, n. 3, p. 303-304, 2009.

SCHMIDT, K. A.; OSTFELD, R. S. **Biodiversity and the dilution effect in disease ecology.** *Ecology*, v. 82, n. 3, p. 609-619, 2001.

SHAAPER, U.; NNAMONU, L. A.; ENEJI, I. S. **Assessment of heavy metals in *Rana esculenta* organs from River Guma, Benue State Nigeria.** *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 2013, 2013.

SILVA, E. B. R. **Samarco dam breach: an environmental disaster on a highly impacted river basin and the use of Leaf Fluctuating Asymmetry for bioindication.** *Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 2020.*

SOARES, H. M. A. **Aumento de assimetria flutuante induzido por rejeito de mineração em *Smicridea (Rhyacophylax) coronata* (Trichoptera).** *Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2023.*

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. M. **Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations.** Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, v. 28, n. 8, p. 1696-1703, 2009.

STOLYAR, O. B. *et al.* **Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine.** Archives of environmental contamination and toxicology, v. 54, p. 107-113, 2008.

STUMPP, R. G. A. V. **Effects of rapid climate change on community structure and cranial morphology of small mammals.** Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2017.

THIEMANN, G. W.; WASSERSUG, R. J. **Patterns and consequences of behavioural responses to predators and parasites in Rana tadpoles.** Biological Journal of the Linnean Society, v. 71, n. 3, p. 513-528, 2000.

UCHIYAMA, M.; KONNO, N. **Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians.** General and comparative endocrinology, v. 147, n. 1, p. 54-61, 2006.

VEDAMANIKAM, V. J.; SHAZILLI, N. A. M. **The effect of multi-generational exposure to metals and resultant change in median lethal toxicity tests values over subsequent generations.** Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 80, p. 63-67, 2008.

WICHER, C. **The effects of mining effluent on amphibian survivorship.** Thesis (Bachelor's Degree) - Department of Natural Sciences at Carroll College, Helena, Montana, 2000.

WALDMAN, B. **Olfactory basis of kin recognition in toad tadpoles.** Journal of Comparative Physiology A, v. 156, p. 565-577, 1985.

WILD, M. *et al.* **Using spatiotemporal ratio analyses to quantitatively estimate water quality recovery of the Rio Doce.** Integrated Environmental Assessment and Management, v. 20, n. 1, p. 74-86, 2024.

ZAKHAROV, V. M.; SHADRINA, E. G.; TROFIMOV, I. E. **Fluctuating asymmetry, developmental noise and developmental stability: future prospects for the population developmental biology approach.** Symmetry, v. 12, n. 8, p. 1376, 2020.

ZHELEV, Z. M. *et al.* **Assessment of ecological status of two rivers with different types of anthropogenic pollution in Southern Bulgaria based on the level of fluctuating asymmetry in the populations of marsh frog *Rana ridibunda* (Amphibia: Ranidae).** *Acta Zoologica Bulgarica*, v. 4, p. 225-231, 2012.