

Proposta de Monitoramento da Biodiversidade Terrestre

Projeto: Assessoria à Gerência Socioambiental

Contrato nº: 4800018497

Ordem de Serviço nº 27

Dezembro, 2020

EQUIPE RESPONSÁVEL

Fundação Renova

Vanessa Queiroz

Renata Stopiglia

Juliana Oliveira

Thiago Alves

Equipe Ekos Brasil

Jaime Ohata – Gerência Técnica

Ana Cristina Moeri – Gestão Administrativa

Marina Aponte de Sampaio Tiengo – Gestão da Informação

Marcela Firens da Silveira – Gestão da Informação

Equipe de Especialistas

Adriano Pereira Paglia – Coordenação equipe / Mastofauna

Alberto de Freitas Castro Fonseca – Avaliação de Impactos Ambientais

Daiana Marques Costa - Especialista em SIG

Felipe Sá Fortes Leite – Herpetofauna

Frederico de Siqueira Neves – Invertebrados

Juraci Alves de Oliveira – Vegetação

Leonardo Esteves Lopes – Avifauna

Marcelo Ferreira de Vasconcelos – Avifauna

Mariana Machado Neves – Dano Biológico

Nelcy Della Santina Mohallem – Contaminantes

Tatiana Cornelissen – Invertebrados

Ricardo Ribeiro de Castro Solar – Análise de dados e desenho amostral

Ricardo Ribeiro Rodrigues – Recuperação de áreas degradadas / Ecologia Vegetal

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	4
1.1	BREVE DESCRIÇÃO DO HISTÓRICO DO ROMPIMENTO.....	4
1.2	PERGUNTAS GERAIS DO PROGRAMA DE MONITORAMENTO	5
1.3	PRINCÍPIOS, PREMISSAS E MODELO CONCEITUAL DO MONITORAMENTO	6
2.	CARACTERIZAÇÃO DOS POTENCIAIS IMPACTOS PERSISTENTES E RECORRENTES	14
2.1	AVALIAÇÕES <i>EX-ANTE</i> E <i>EX-POST</i> DE IMPACTOS NA BACIA DO RIO DOCE.....	14
2.2	OS IMPACTOS PERSISTENTES E RECORRENTES NA FAUNA E FLORA TERRESTRE	15
2.2.1	Áreas Diretamente Afetadas (ADA) e Áreas de Influência Direta (AID).....	15
2.2.2	Estressores e impactos crônicos na fauna e flora terrestre	20
2.2.3	Avaliação da magnitude dos impactos persistentes e recorrentes na fauna e flora terrestre .	22
3.	CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DE RESTAURAÇÃO NA BACIA.....	23
4.	DEFINIÇÃO DA MALHA AMOSTRAL	32
4.1.	MALHA AMOSTRAL PARA MONITORAMENTO DOS IMPACTOS DA DEPOSIÇÃO DO REJEITO ..	32
4.1.1.	Priorização de fragmentos florestais no trecho Fundão – UHE Risoleta Neves usando o processo analítico hierárquico (AHP).....	33
4.1.2.	Sítios amostrais para o monitoramento dos eventuais impactos crônicos em ilhas fluviais e áreas de restinga.....	44
4.2.	MALHA AMOSTRAL PARA MONITORAMENTO DA RESTAURAÇÃO	46
4.3.	Malha Amostral para Organismos com Características Biológicas Específicas	47
5.	PERGUNTAS ESPECÍFICAS DO MONITORAMENTO, COM CONTEXTUALIZAÇÃO, HIPÓTESES, indicadores PREDIÇÕES e metodologia	48
5.1.	TEMA 1: QUAIS OS IMPACTOS CRÔNICOS (PERSISTENTES OU RECORRENTES) DO EVENTO SOBRE AS ESPÉCIES DA FAUNA E FLORA TERRESTRES DA BACIA DO RIO DOCE, E QUAL A MAGNITUDE E ABRANGÊNCIA ESPACIAL E TEMPORAL DESTES IMPACTOS?.....	49
5.1.1.	Bases conceituais	49
5.1.2.	Perguntas e indicadores relacionados aos contaminantes presentes no rejeito que podem persistir na biota terrestre	51
5.1.3.	Perguntas e indicadores que buscam entender os efeitos derivados do impacto original nas comunidades de flora e fauna	81
5.2.	TEMA 2: HÁ UMA TENDÊNCIA DE AUMENTO DE CONDIÇÕES AMBIENTAIS FAVORÁVEIS PARA O RESTABELECIMENTO DE POPULAÇÕES DE ANIMAIS E PLANTAS E DOS PROCESSOS ECOLÓGICOS AFETADOS PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM?	120
5.2.1	Bases conceituais	120
5.2.2	Pergunta e indicadores relacionados à tendência de melhoria na bacia	122
5.3.	TEMA 3: AS AÇÕES DE RESTAURAÇÃO, RECUPERAÇÃO E COMPENSAÇÃO DA BACIA DO RIO DOCE ESTÃO LEVANDO À RECUPERAÇÃO DA FLORA, FAUNA E FUNCIONAMENTO DO ECOSSISTEMA? OBSERVA-SE MELHORIA NA ABUNDÂNCIA, DISTRIBUIÇÃO OU RIQUEZA DE ESPÉCIES OU GRUPOS FUNCIONAIS AMEAÇADOS, SENSÍVEIS OU CHAVE, NOS DIFERENTES CONTEXTOS AFETADOS?.....	124

5.3.1 Bases conceituais.....	124
5.3.2 Perguntas e indicadores relacionados ao processo de regeneração e recuperação ambiental da biota terrestre pós-desastre.....	125
6. SÍNTESE DOS TEMAS, PERGUNTAS, INDICADORES E PROGRAMA DE AMOSTRAGEM.....	161
7. PROTOCOLOS GERAIS PARA ANÁLISES ESTATÍSTICAS E CURADORIA DOS DADOS.....	164
8. BIBLIOGRAFIA.....	170

1. INTRODUÇÃO

1.1 BREVE DESCRIÇÃO DO HISTÓRICO DO ROMPIMENTO

O rompimento da barragem de rejeitos de Fundão, de propriedade da Samarco S.A. (doravante Samarco), localizada no Complexo Industrial de Germano em Mariana, MG, no dia 5 de novembro de 2015 resultou no despejo de cerca de 44 milhões de metros cúbicos de água e rejeito ao longo dos cursos d'água da bacia do rio Doce (Golder Associates, 2016a). O arrasto mecânico da mancha de rejeitos destruiu vegetação nativa, áreas de atividade agropecuária, estruturas físicas, distritos e vilas, provocando a morte de 19 pessoas (IUCN, 2018). À medida que avançava pelos cursos d'água na bacia do rio Doce, boa parte do rejeito foi se depositando nas margens ao longo do trecho entre a barragem e o reservatório de Candonga (Usina Hidroelétrica Risoleta Neves) e a pluma remanescente seguiu pelo leito do rio Doce, atingindo o oceano.

Em março de 2016, como forma de otimizar a gestão sobre a situação do ambiente e das populações afetadas, foram desenvolvidos junto às autoridades ambientais planos e procedimentos em resposta aos impactos ambientais resultantes do rompimento da barragem de Fundão, que gerou o Termo de Transação e Ajustamento de Conduta (TTAC), com diversas cláusulas a serem atendidas, sendo a Fundação Renova a principal responsável por sua implantação, condução e monitoramento. Dentre as diversas cláusulas do TTAC, a cláusula 168 diz respeito à identificação e caracterização dos impactos decorrentes do evento sobre as espécies terrestres ameaçadas de extinção. Tal caracterização foi realizada pela empresa Golder Associates Brasil Consultoria e Projetos Ltda, que elaborou o estudo Avaliação de Impacto sobre as Espécies Terrestres Ameaçadas de Extinção (Golder Associates 2016a), aprovado parcialmente em agosto de 2017 pelo Comitê Inter Federativo (CIF), que solicitou a apresentação de Plano de Trabalho para elaboração do Plano de Ação (PA) para conservação da fauna e flora terrestre. O PA Rio Doce foi elaborado pela empresa Bicho do Mato Instituto de Pesquisa e indicou originalmente 142 ações que após agrupamentos foram consolidadas em 92 Ações reparatórias e compensatórias. O marco oficial de início da execução do Plano de Ação para Conservação da Biodiversidade Terrestre deu-se em outubro de 2019. O Plano de Ação encontra-se atualmente em fase de monitoria e acompanhamento e um estudo foi conduzido pela Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável (FBDS) para aprimorar as ações do Plano. Dentre as diversas ações do Plano está a elaboração e execução do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Terrestre.

Uma das etapas do Programa de Monitoramento, previsto no TTAC, foi a realização da Avaliação Ecológica Rápida (AER), executada conforme Parecer Técnico do IBAMA, seguindo a metodologia RAPELD para o monitoramento de vertebrados, invertebrados, vegetação e solos. O primeiro ano da Avaliação Ecológica Rápida realizou duas campanhas, uma na estação seca e outra na chuvosa. As campanhas produziram um extenso banco de dados sobre fauna e flora nos blocos amostrados ao longo da bacia do rio Doce (Bicho do Mato, 2020).

Ao final de 2019 foi realizado o workshop de avaliação dos resultados do primeiro ano do monitoramento. Ficou claro durante o workshop que os resultados obtidos durante a AER não foram capazes de responder às perguntas originais e que, tal como previsto no TTAC seria necessário reavaliar os princípios, as perguntas, a metodologia e os indicadores do monitoramento da biodiversidade terrestre.

Em dezembro de 2019 foi realizado o "Workshop para Definição de Indicadores de Resultados da

Biodiversidade dos Programas 28 e 30” tendo como principais objetivos: o alinhamento do conceito de Indicadores de Biodiversidade; a validação das premissas e dos critérios para construção de Indicadores de Biodiversidade dos Programas 28 e 30 (PG28 e PG30); a construção de indicadores para os Programas; e a criação de consensos para construção do mapa de indicadores.

Em virtude dos resultados e da discussão relacionada ao relatório da Avaliação Ecológica Rápida e do Workshop de definição de Indicadores do PG30, a Fundação Renova solicitou ao Instituto Ekos Brasil a elaboração do novo Programa Monitoramento da Biodiversidade Terrestre. Face ao exposto, o presente documento propõe a adequação dos estudos já realizados, atentando para o fato de não criar divergências entre os grupos de especialistas envolvidos nos trabalhos de monitoramento dos diversos programas. Basicamente, o trabalho envolve a adequação do monitoramento da Biodiversidade Terrestre, alinhada com as metodologias IBAMA, ICMBio e Painel Rio Doce e reflete o amadurecimento das discussões e recomendações propostas pelo Instituto Ekos Brasil.

1.2 PERGUNTAS GERAIS DO PROGRAMA DE MONITORAMENTO

Transcorridos mais de 5 anos desde o rompimento da barragem de Fundão constata-se que os impactos socioambientais seguem sendo identificados, monitorados e avaliados de forma fragmentada e sem padronização metodológica, contrariamente às recomendações de especialistas (e.g. L.E. Sánchez et al., 2018; Sánchez et al., 2019). Além disso, os dados que têm sido gerados nessas diversas avaliações de impacto estão começando a suscitar dúvidas em relação à sua utilidade para o gerenciamento efetivo dos danos sociais e ambientais. É o caso, por exemplo, do monitoramento da biodiversidade (fauna e flora) terrestre do rio Doce no âmbito do Programa 30 da Fundação Renova, que foi previsto na subseção III.3 do Termo de Transação e Ajustamento de Conduta firmado entre Samarco, suas acionárias, Vale e BHP, e diversos órgãos públicos da União e dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (TTAC, 2016).

Após o rompimento e em função da caracterização dos impactos e do TTAC, um conjunto de perguntas relacionadas aos impactos do rompimento sobre a biodiversidade foram elaboradas e serviram de norteador para as ações do PG30 da Fundação Renova. Ao final de 2019, o Instituto Ekos Brasil iniciou a avaliação do conjunto original das oito perguntas considerando o tempo decorrido desde o desastre, o cenário atual na bacia do rio Doce, as ações executadas pela Fundação Renova e os resultados obtidos pelo primeiro ano da Avaliação Ecológica Rápida (AER). A conclusão do estudo do Instituto Ekos Brasil foi que o conjunto original de perguntas para o monitoramento da biodiversidade impactada deveria ser revisto, tendo em vista não apenas que muitas delas estavam inadequadas, mas também que deveria ser estabelecida uma mudança de perspectiva do monitoramento da biodiversidade, avaliando-se as respostas da biota terrestre em relação às ações de recuperação da bacia.

Inicialmente, as ações de monitoramento do PG30 dedicavam-se à caracterização da biota e à identificação e mensuração dos impactos decorrentes do rompimento. Em virtude do tempo transcorrido, das condições atuais e dos resultados obtidos na AER sugere-se que essas ações e esforços sejam direcionados aos processos de recuperação ambiental, avaliando-se a possibilidade de persistência, recorrência ou aumento dos impactos, assim como a significância e como repercutem na fauna e flora. Nas áreas diretamente atingidas pela lama de rejeito de mineração, já mapeadas, predominam ações de reparação e, nesse caso, cabe avaliar a qualidade dessas ações ao longo do tempo e o potencial para recuperação da biodiversidade terrestre.

Nesse sentido, o Instituto Ekos Brasil (2020) propôs, para o monitoramento da biodiversidade terrestre, três novas perguntas gerais, ou Temas, que servirão de norteadores para as perguntas específicas elencadas nos tópicos seguintes deste documento e para a definição dos indicadores biológicos que serão utilizados em busca das respostas. Os Temas são:

1. Quais os impactos persistentes ou recorrentes do evento sobre as espécies da fauna e flora terrestres da Bacia do rio Doce, qual a magnitude, a abrangência espacial e temporal destes impactos?
2. Há tendência de aumento de condições ambientais favoráveis para o restabelecimento de populações de animais e plantas e dos processos ecológicos afetados pelo rompimento da barragem?
3. As ações de restauração, recuperação e compensação da bacia do rio Doce estão levando ao aumento na abundância, distribuição ou riqueza de espécies ou grupos funcionais ameaçados, sensíveis ou chave, nos diferentes contextos afetados?

1.3 PRINCÍPIOS, PREMISSAS E MODELO CONCEITUAL DO MONITORAMENTO

A presente proposta de monitoramento contempla a área terrestre diretamente afetada pela lama de rejeito de mineração, compreendendo o trecho entre Mariana e a Usina Hidroelétrica (UHE) Risoleta Neves, outrora denominada Bloco 4 (no estudo de Avaliação Ecológica Rápida, realizado pela empresa Bicho do Mato) ou Segmento 1 (estudo realizado pela Golder). Contempla também áreas no estado do Espírito Santo, notadamente as ilhas no rio Doce e áreas de restinga na foz. Para a elaboração da proposta de novo programa de monitoramento a equipe do Instituto Ekos Brasil adotou os seguintes princípios:

1. O monitoramento deve ser baseado nos impactos (negativos e positivos) que podem afetar a biota terrestre;
2. Os indicadores biológicos devem ser selecionados a partir de sua sensibilidade aos impactos e adequados para cada sub-região impactada. Devem ser SMART (sigla para específicos, mensuráveis, atingíveis, relevantes, temporais) e devem, também, atender aos critérios estabelecidos no Relatório de Definição de Indicadores de Biodiversidade (Programas 28 e 30) (Instituto Ekos Brasil, 2020) apresentados na Tabela 1;

Tabela 1: Critérios para Definição de Indicadores de Biodiversidade

Critérios para Definição de Indicadores	
1	É desejável que o indicador seja associado a uma escala espacial definida, vinculada ao impacto do agente estressor ou à sua recuperação.
2	É desejável que o indicador seja associado a uma escala temporal definida, vinculada ao impacto do agente estressor ou à sua recuperação.
3	É desejável que o indicador responda a vetores de degradação ambiental específicos resultantes do rompimento da Barragem (sólidos suspensos, contaminação, perda de habitat, dentre outros).

Critérios para Definição de Indicadores	
4	É obrigatório que, para definição do indicador, existam informações suficientes e adequadas sobre ecologia e biologia dos organismos, comunidades, ecossistemas e/ou processos a serem monitorados que permitam formulação de hipóteses, predições ou interpretações dos resultados.
5	É desejável que os indicadores sejam vinculados a organismos que permitam obter simultaneamente mais de uma informação ambiental.
6	É obrigatório que os indicadores sejam vinculados a organismos ou fenômenos que tenham abundância e/ou frequência de ocorrência adequadas e viáveis para a amostragem (isto é, suficientemente altas para inferência). Portanto, exclui espécies ou fenômenos raros.
7	É desejável que os indicadores sejam vinculados a organismos e/ou funções ecossistêmicas com percebida importância social, econômica, de saúde humana ou de qualidade ambiental ou de vida.
8	É desejável que os indicadores sejam vinculados a organismos ou processos que respondam de forma proporcional à degradação ambiental e, conversamente, recuperação ambiental.
9	É desejável que os indicadores tenham um caráter integrativo dentro dos objetivos dos programas de monitoramento e recuperação da Bacia do rio Doce como um todo, ou seja, que possam ser utilizados simultaneamente por mais de um programa.
10	É desejável que os indicadores tenham um histórico sólido, continuado e robusto de coleta de dados na área de estudo anterior ao rompimento da Barragem de Fundão.

3. O desenho amostral deve ser representativo, com uma rede de amostragem que seja capaz de capturar a variação estrutural na paisagem impactada (relevo, uso e cobertura do solo, geologia, etc) bem como incluir áreas de referência em regiões não impactadas pelo evento ou pelas ações de restauração;
4. O monitoramento deve proporcionar rigor científico e metodológico para inferências robustas;
5. Os indicadores biológicos a serem selecionados devem ser capazes de responder a perguntas sobre padrões e processos ecológicos em diferentes níveis de organização biológica (genes a paisagens); e
6. O monitoramento deve ser adaptativo, ou seja, ser capaz de ajustes com inclusão/exclusão de perguntas e indicadores à medida que as evidências vão sendo produzidas.

A presente proposta, considerando as premissas e critérios estabelecidos no Workshop Indicadores da Biodiversidade (Instituto Ekos Brasil, 2020), pretende utilizar o menor número de indicadores possível, porém, potencialmente mais eficazes. A proposta busca, também, facilitar e incentivar a integração com outros programas da Fundação Renova (PG28 Biodiversidade Aquática, PG23 Manejo de Rejeitos, PG25 Revegetação, Enrocamento e Outros Métodos, PG26 Programa de Recuperação de Áreas de Preservação Permanente (APPs) e Recargas Hídricas e PG27 Recuperação e Restauração Ambiental) através da busca por padronização da linguagem e nomenclatura, diretrizes, ações, espacialização e perguntas gerais. Ao final do monitoramento, o estudo deve ser capaz de detectar padrões de biodiversidade em resposta aos impactos ou às ações de restauração.

A reformulação do monitoramento da biodiversidade deve partir, portanto, de perguntas e propostas

orientadoras, buscando definir os impactos mais relevantes para determinada espécie ou sistema, avaliando impactos de estressores negativos (presença do rejeito) e positivos (proteção dos fragmentos naturais remanescentes e ações de restauração), assim como a significância de cada impacto, como ele afeta a população, a espécie, a comunidade ou os processos ecológicos.

O modelo conceitual desta proposta de programa de monitoramento levará em conta os três Temas Gerais, ou perguntas norteadoras, indicadas no tópico anterior. Sob a égide destes Temas, estarão aninhadas as perguntas específicas acompanhadas de seus indicadores mais eficazes. Por meio destas perguntas, em um desenho amostral robusto e baseado em hipóteses, pretende-se que este novo plano seja capaz de fornecer dados que permitam chegar o mais próximo possível donexo causal entre o desastre e os efeitos encontrados atualmente (5 anos após o desastre) na biodiversidade terrestre.

Antes da exposição das perguntas em si, faz-se necessário explicitar as premissas sob as quais se assentaram estas perguntas e a proposta de monitoramento como um todo. Portanto, foram consideradas as seguintes premissas para o delineamento das perguntas deste plano (Figura 1):

Premissa #1: O impacto agudo, aquele de alta intensidade e curta duração, geralmente levando a modificações drásticas nas comunidades (Gerritsen & Patten, 1985; Chenson & Huntly 1997), não é mais passível de detecção, devido ao lapso temporal de cinco anos entre o desastre e o monitoramento. É, portanto, imprescindível focar esforços no monitoramento dos impactos crônicos, aqueles persistentes ou recorrentes no ambiente, de menor potencial destrutivo imediato, mas de duração mais longa e escala mais ampla na comunidade (Chenson & Huntly 1997, Ribeiro et al. 2015).

Premissa #2: É extremamente difícil, pela natureza do ambiente, dissociar os impactos da deposição e presença do rejeito (impacto de foco) dos demais impactos históricos e atuais, ainda presentes e atuantes na bacia (impacto de fundo), como alteração de uso do solo, uso agrícola do solo, processos erosivos, recorrência de fogo, extrativismo e outros.

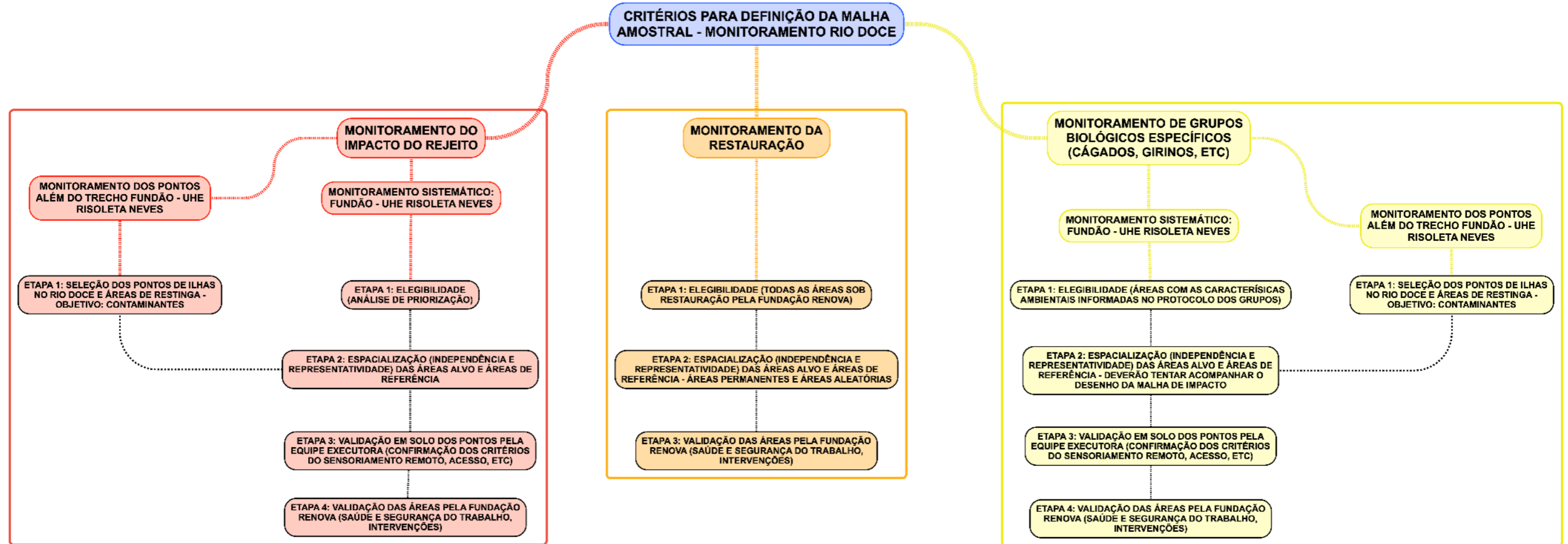
Premissa #3: Os impactos do desastre e as características da paisagem interagem como causadores dos efeitos estudados na biodiversidade e sua recuperação.

Premissa #4: Para observação de efeitos do desastre na biota terrestre, a área significativa a ser monitorada é o trecho entre a barragem de Fundão e a UHE Risoleta Neves, tendo em vista que após a UHE o impacto do rompimento esteve concentrado majoritariamente na calha do rio Doce, e mesmo que tenha havido pontos de extravasamento, pode-se assumir que há poucas interações com a biota terrestre, fato esse detectado nas amostras do primeiro ano da AER, cujos resultados apontam para a ausência de efeito significativo da distância do rio sobre parâmetros ecológicos para a grande maioria dos grupos amostrados (Bicho do Mato, 2019). Assim, partir da UHE Risoleta Neves, somente as ações planejadas de recuperação ambiental deverão ter efeito sobre a biota terrestre, devendo ser monitorada apenas nas paisagens que receberam tais ações. Adicionalmente, considera-se importante monitorar ambientes especialmente frágeis às mudanças, onde alguns impactos da deposição de rejeitos sobre a biota terrestre podem ainda estar atuantes, como as ilhas fluviais ao longo do rio Doce e as áreas de restinga localizadas à foz do rio.

Premissa #5: A escolha dos indicadores biológicos seguiu as premissas e critérios apresentados no Relatório de Definição de Indicadores de Biodiversidade (PG28 e 30), elaborado pelo Instituto Ekos Brasil (2020).

Premissa #6: As perguntas têm como escala espacial de foco a paisagem. A escolha das unidades na paisagem deve necessariamente seguir critérios que permitam obter áreas representativas da paisagem, tanto em relação aos efeitos do desastre como em relação aos impactos pré-existentes e, também, a proposição de indicadores eficazes.

Figura 1: Organização das premissas e justificativas do Programa de Monitoramento



Explicitadas as premissas para o plano de monitoramento, são apresentados os três Temas Gerais norteadores do programa de monitoramento. Esses Temas são aqueles indicados no relatório do Instituto Ekos Brasil, com algumas modificações que expressam o avanço conceitual e metodológico resultado das discussões integradas da equipe do presente estudo

1. Quais os impactos crônicos (persistentes ou recorrentes) do evento sobre as espécies da fauna e flora terrestres da bacia do rio Doce e qual a magnitude, abrangência espacial e temporal destes impactos?
2. Há tendência de aumento das condições ambientais necessárias para o restabelecimento de populações de animais e plantas e processos ecológicos afetados pelo rompimento da barragem?
3. As ações de restauração, recuperação e compensação da bacia do rio Doce estão levando a um aumento na cobertura de formações naturais, na abundância, distribuição ou riqueza de espécies ou grupos funcionais ameaçados, sensíveis ou chave, bem como uma melhoria do funcionamento e do provimento de serviços ecossistêmicos desses ecossistemas, nos diferentes contextos afetados?

Com as premissas e perguntas claramente colocadas, foi elaborado o mapa conceitual do programa de monitoramento (Figura 2). No mapa, mostra-se que para a pergunta/tema 1, apesar do reconhecimento dos possíveis efeitos dos impactos agudos, entende-se que a partir de agora somente seus efeitos crônicos serão foco do monitoramento. Estes impactos crônicos podem ter duas origens, sendo (1) Impactos derivados da presença (atual ou pretérita) do rejeito nas áreas e interação com as condições da bacia e (2) Impactos derivados das ações de reparação de danos da Fundação Renova. O foco principal é no primeiro caso, apesar de sempre considerar a existência do segundo, e sugere-se que sempre haja diálogo entre as equipes temáticas da Fundação Renova, de forma a incluir estes impactos do segundo caso nos modelos. Com o objetivo de um desenho robusto o suficiente para separar o nexos causal desejado, propõe-se o monitoramento em nível de populações e comunidades biológicas.

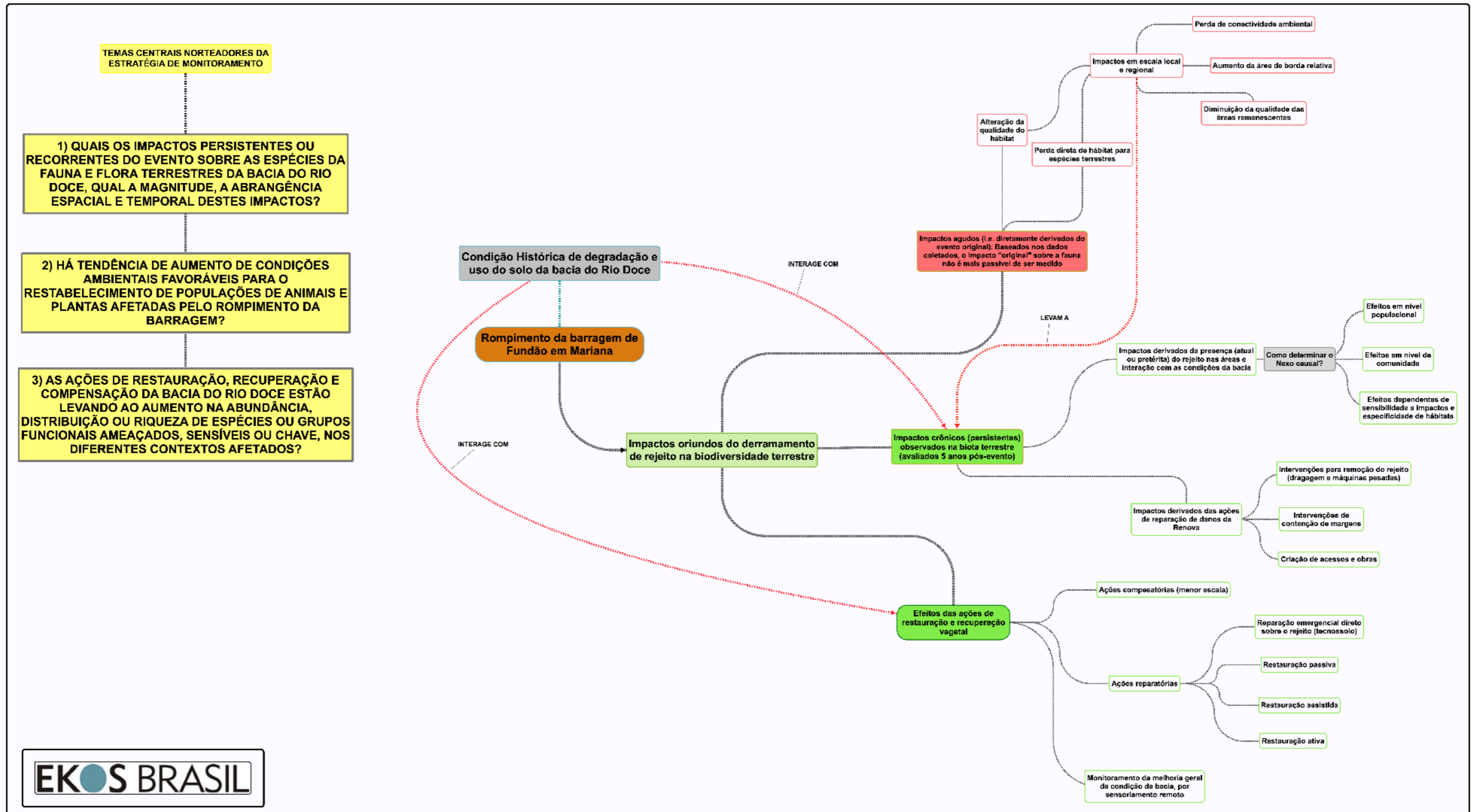
Para a segunda pergunta/tema, entende-se que a melhoria geral da bacia, gerada pelas ações de recuperação, deve ser avaliada através de métodos de sensoriamento remoto (p. ex. Imagens de satélite e sobrevoos por UAVs e imagens multiespectrais). O sensoriamento remoto é capaz de fornecer métricas de paisagem, que são sabidamente importantes para a recuperação da fauna e flora, como por exemplo, métricas de conectividade, de evolução de fragmentos naturais remanescentes, de provimento de serviços ecossistêmicos e outros. O objetivo das ações de recuperação deve sempre visar a melhoria dessas condições ambientais da paisagem.

Já para a pergunta/tema 3, relativa à regeneração, focou-se nas ações reparatórias executadas pela Fundação Renova. A avaliação considerará a recuperação estrutural da vegetação remanescente e das áreas em restauração, mas também a recuperação ecológica das interações dos organismos entre si e com o meio (Hembry & Weber 2020) e do funcionamento do ecossistema (Naeem et al., 1994; Loreau et al., 2003).

Desta forma, o plano de monitoramento apresentada objetiva entender os efeitos de longo prazo do rompimento da barragem de Fundão no trecho do alto rio Doce. Entende-se e adota-se a ideia de que este é um cenário complexo de uso e ocupação do solo e atividades antrópicas. O trabalho considera, ainda, que a situação gerada pelo desastre contribuiu para a deterioração das condições socioambientais da bacia. A proposta de monitoramento considera os fragmentos florestais do trecho entre Fundão e a UHE Risoleta Neves, as ilhas

fluviais e as restingas como sendo as unidades de avaliação que representam a complexidade do cenário, e os gradientes naturais de impacto.

Figura 2: Mapa mental com o modelo conceitual geral do monitoramento



2. CARACTERIZAÇÃO DOS POTENCIAIS IMPACTOS PERSISTENTES E RECORRENTES

2.1 AVALIAÇÕES EX-ANTE E EX-POST DE IMPACTOS NA BACIA DO RIO DOCE

A ‘avaliação de impacto ambiental’ é um conceito guarda-chuva, que descreve diversos tipos de ferramentas de gestão ambiental. Tais avaliações podem ser utilizadas em diferentes contextos, tanto para prever impactos (avaliações *ex-ante*), quanto para gerenciar e monitorar impactos persistentes e recorrentes (avaliações *ex-post*). Por exemplo, a avaliação de impacto pode ajudar a balizar o gerenciamento de indústrias com certificação na norma ISO 14001 (Whitelaw, 2004), caracterizar áreas contaminadas (Ebel & Davitashvili, 2005), subsidiar tomadas de decisão no licenciamento ambiental (Fonseca, 2015), dentre tantas outras aplicações.

Antes do rompimento da barragem, as mineradoras Samarco e Vale já tinham uma rotina de identificação e avaliação de impactos ambientais imposta pela certificação na Norma ISO14001 da ABNT de Sistema de Gestão Ambiental, que subsidiavam a documentação, implementação, manutenção e melhoria contínua da gestão ambiental no complexo minerador.

Após o colapso da barragem de Fundão, uma série de avaliações de impacto se somaram às então existentes. Por exemplo, entidades públicas e privadas acionaram avaliações urgentes de identificação e monitoramento de impactos, aos moldes das Avaliações Rápidas de Impacto Pós-desastre (Kelly, 2005; Kelly, 2013), para subsidiar as ações emergenciais de reparação e mitigação de danos, em cumprimento a ações judiciais e termos de ajustamento de conduta. Nesse contexto, a empresa Golder Associates, em atendimento ao TTAC, realizou uma das primeiras avaliações dos impactos do rompimento da barragem de Fundão na bacia do rio Doce, divulgada em julho de 2016 (Golder Associates, 2016b), que contemplou, inclusive, uma avaliação preliminar dos impactos na fauna e flora terrestre. Meses depois, foi concluída uma outra avaliação de impacto mais direcionada à identificação de impactos nas espécies terrestres ameaçadas de extinção (Golder Associates, 2016a). Posteriormente, foi implementado um programa de monitoramento da fauna e flora terrestre, baseado na metodologia RAPELD, que deu base ao Plano de Ação Para a Conservação da Biodiversidade Terrestre na bacia (Bicho do Mato e Fundação Renova, 2020). Além dessas avaliações, algumas obras, sobretudo aquelas que precisam de licenças ambientais, têm demandado avaliações pontuais de impacto ambiental. Além dos novos distritos de Bento Rodrigues e Paracatu de Baixo, o próprio complexo minerador da Samarco foi novamente escopo de uma avaliação prévia de impacto para subsidiar o pedido de licença de operação corretiva (LOC) (Amplio Engenharia, 2017).

Passados mais de 5 anos desde o rompimento da barragem de Fundão, os impactos do rompimento seguem sendo identificados, monitorados e avaliados sob diversas metodologias, de modo a atender os objetivos específicos dos programas socioambientais e as expectativas das mais diversas partes interessadas. Tal situação é compreensível e inevitável, pois, apesar dos benefícios das avaliações integradas e padronizadas (e.g. Sánchez et al., 2018; Sánchez et al., 2019), existe uma série de requisitos legais e judiciais que impõe a necessidade de múltiplas abordagens de avaliação e monitoramento de impactos na bacia. Além disso, sendo o território um espaço dinâmico e em constante transformação, faz-se imprescindível a criação e o contínuo

aperfeiçoamento de metodologias de avaliação e monitoramento de impactos.

2.2 OS IMPACTOS PERSISTENTES E RECORRENTES NA FAUNA E FLORA TERRESTRE

2.2.1 Áreas Diretamente Afetadas (ADA) e Áreas de Influência Direta (AID)

Uma das primeiras e mais importantes etapas das avaliações de impactos, seja *ex-ante* ou *ex-post*, é compreender os limites espaciais onde ocorrem ou podem ocorrer impactos diretos ou indiretos nos objetos de análise. É comum, na prática global e brasileira, a delimitação de diversos tipos de área. Dentre os exemplos mais em uso na avaliação de grandes projetos no Brasil, estão: Área Diretamente Afetada (ADA); Áreas de Influência Direta (AID) e Indireta (AII); Área de Abrangência Regional (AAR); Área de Entorno (AE); Área de Estudo (Aest); Área de Influência Expandida (AIE); Área de Abrangência Sísmica (AAS); Área de intervenção (AI); Área de Influência Total (AIT); Área do Entorno do Reservatório Artificial (AER); Área de Entorno do Empreendimento (AEE) e Área de Influência Remota (AIR) (Santos e Fonseca, 2016). Apesar da diversidade de áreas e da falta de padronização, destacam-se, ao menos, dois tipos de áreas que são largamente utilizadas na prática de brasileira e global, quais sejam, as áreas diretamente afetadas (ADA) e as áreas de influência direta (AID). Além disso, essas áreas são comumente inseridas no contexto espacial dos limites de bacias hidrográficas, no caso das avaliações dos impactos biofísicos, e dos limites administrativos de municípios, no caso das avaliações de impactos sócio-econômicos (Morgan, 1998; Sánchez, 2008; Glasson & Therivel, 2019).

As definições dos limites das ADAs e AIDs devem se dar caso-a-caso, observando as especificidades territoriais, bem como as especificidades dos empreendimentos ou atividades que causam impactos. No caso dos impactos associados ao rompimento da barragem de Fundão, observa-se claramente duas configurações de dispersão dos impactos: 1) uma de natureza linear, que corresponde aos impactos do rejeito ao longo das calhas e margens dos cursos d'água a jusante da barragem de Fundão. E, nesse caso, destaca-se o trecho localizado entre a barragem de Fundão (situada no complexo minerador de Germano, da Samarco) e o barramento principal da Usina Hidrelétrica Risoleta Neves, também conhecida como barragem de Candonga, que conteve em seu respectivo reservatório grande parte do rejeito liberado na bacia; e 2) uma de natureza radial, que corresponde aos impactos associados a atividades de reparação e compensação ambiental que estão sendo implementadas em fragmentos territoriais ao longo da bacia. Nesse sentido, para fins de monitoramento dos impactos persistentes e recorrentes na fauna e flora terrestre recomenda-se duas abordagens de definição espacial das ADAs e AIDs, de modo a contemplar as especificidades das dispersões linear e radial dos impactos (Tabela 2).

Tabela 2: Principais áreas de interesse para o Monitoramento dos Impactos Persistentes e Recorrentes na Fauna e Flora Terrestre

Tipos	Trecho Fundão-UHE Risoleta Neves (dispersão linear)	Fragmentos territoriais em restauração (dispersão radial)
ADA	Cursos d'água e margens diretamente impactados pelo rejeito	Porção da propriedade rural que está ou estará em restauração, recuperação e compensação ambiental
AID	<i>Buffer</i> de 500 m em relação à ADA	<i>Buffer</i> de 500 m em relação à ADA

Os limites das ADAs correspondem aos limites das áreas dos cursos d'água e respectivas porções territoriais marginais diretamente afetados pelo rejeito (no trecho Fundão-UHE Risoleta Neves, ver Figura 3, Figura 4, Figura 5), bem como pelas porções das propriedades que estão em processo de restauração ambiental (fragmentos territoriais). As AIDs, que foram e são potencialmente impactadas por material particulado, ruídos, obras auxiliares, etc., correspondem às áreas adjacentes situadas a até 500 m da ADA no trecho Fundão- UHE Risoleta Neves, ou 500 m das ADAs relacionadas aos fragmentos territoriais em recuperação ambiental. Tais valores (i.e. 500 metros) refletem valores comumente utilizados e recomendados para as avaliações de impactos biofísicos de grandes projetos (CETESB, 2014). Cumpre salientar que os impactos diretos e indiretos tendem a apresentar um comportamento de gradiente, tendendo a perder magnitude à medida que se afasta da área diretamente afetada (Sánchez, 2008).

De maneira geral, os impactos persistentes e recorrentes de maior magnitude na fauna e flora terrestre estão situados nas ADAs, enquanto os impactos de menor magnitude estão situados nas AIDs. Todavia, as localizações específicas dos diversos impactos podem variar significativamente dentro da ADA e da AID, tendo em vista que essas áreas cobrem vastas porções do território da bacia do rio Doce, que possuem significativas diferenças ecológicas e de uso e ocupação do solo. A ADA e AID, somente no trecho Fundão- UHE Risoleta Neves, cobrem 2.204,25 ha e 23.373,20 ha, respectivamente (Figura 3, Figura 4, Figura 5, Anexo 1). Nesse sentido, conforme apresentado na seção 2.2.3, avaliações adicionais são necessárias para a caracterização das magnitudes dos diversos impactos dentro das áreas de interesse.

Figura 3: Áreas de Interesse para Monitoramento da Biodiversidade Terrestre no Trecho Fundão-Candonga – Área 1

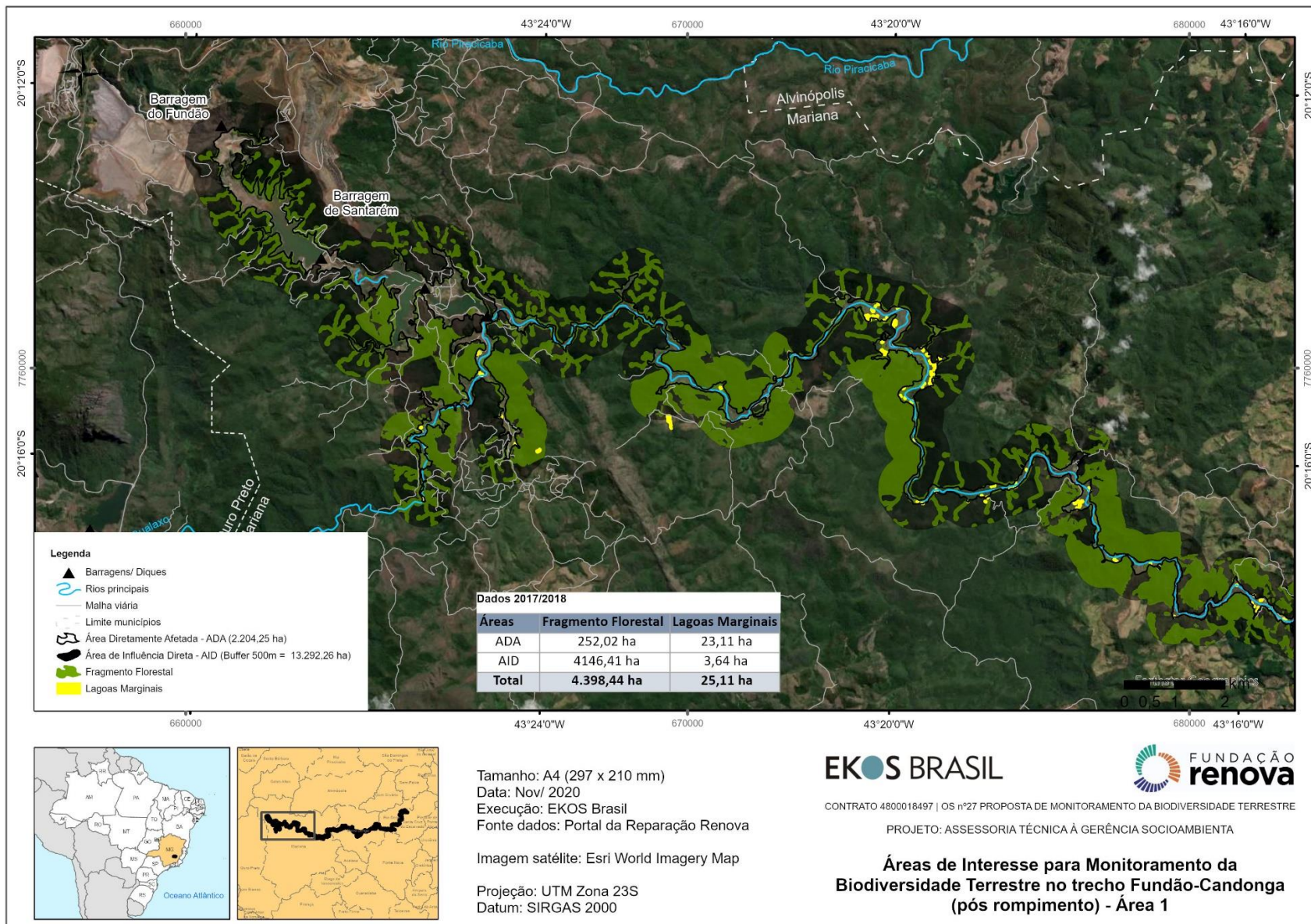


Figura 4: Áreas de Interesse para Monitoramento da Biodiversidade Terrestre no Trecho Fundão-Candonga – Área 2

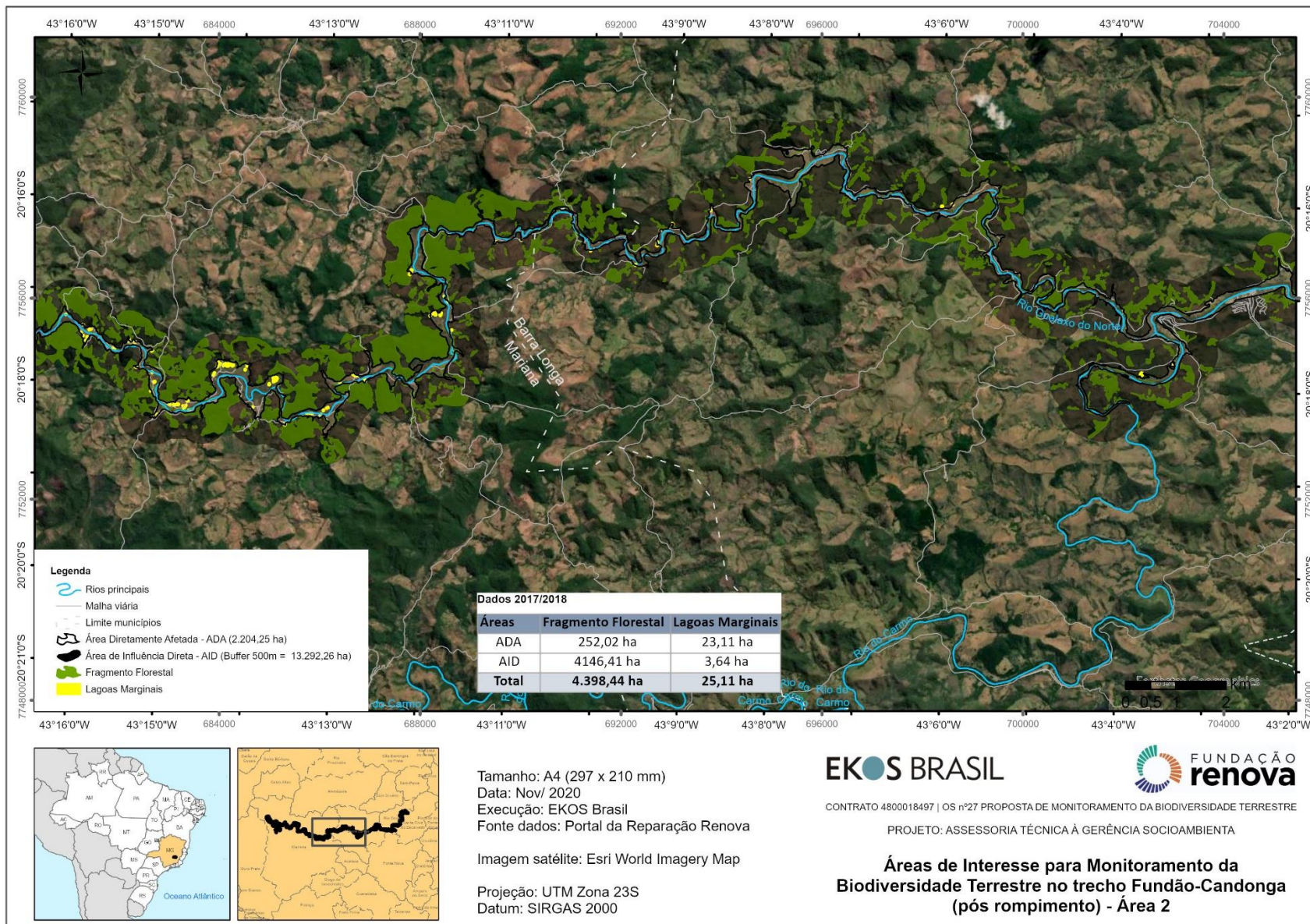
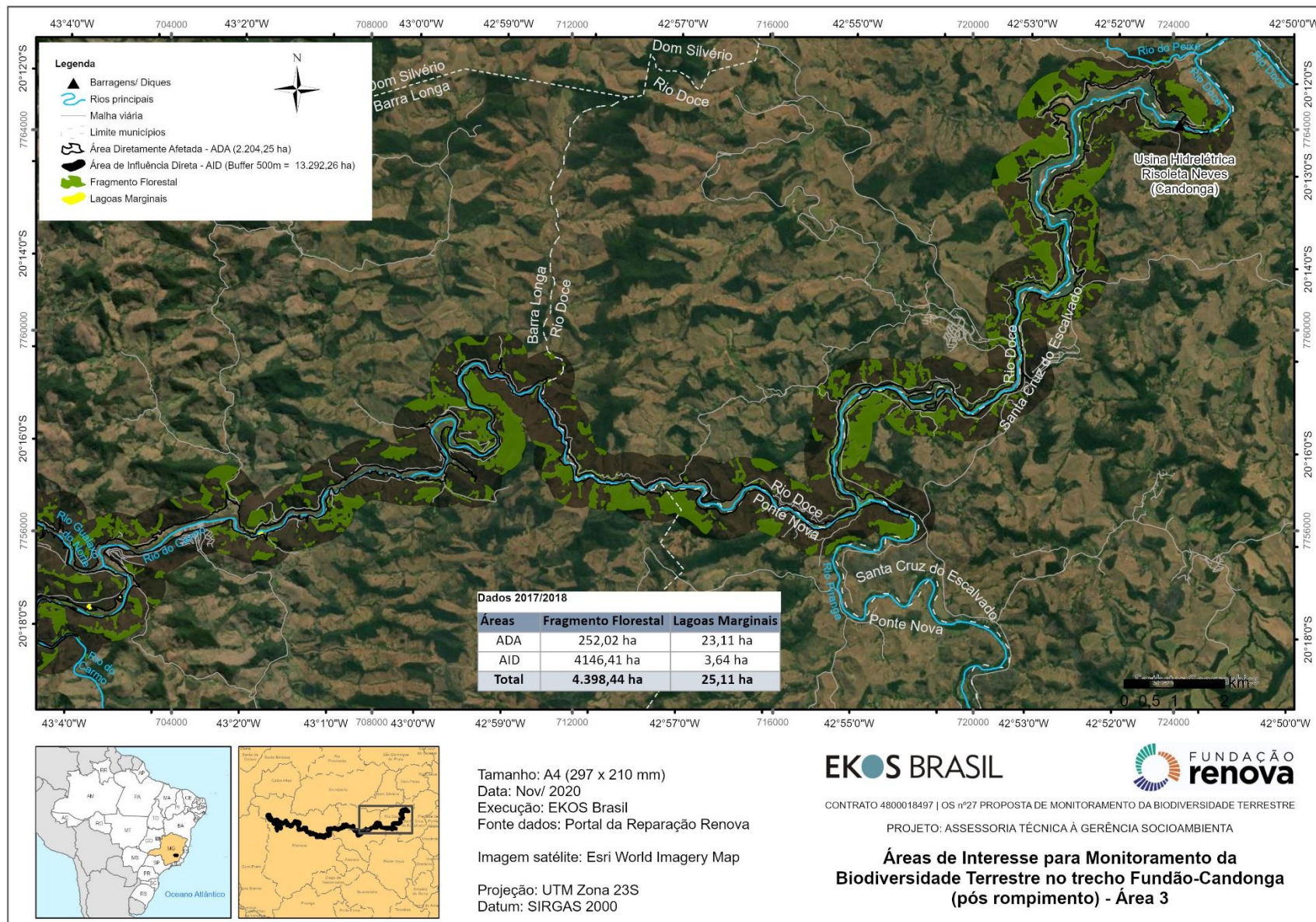


Figura 5: Áreas de Interesse para Monitoramento da Biodiversidade Terrestre no Trecho Fundão-Candonga – Área 3



2.2.2 Estressores e impactos crônicos na fauna e flora terrestre

A avaliação dos impactos crônicos (aqueles persistentes e recorrentes) sobre a biodiversidade terrestre, passados mais de 5 anos do rompimento da barragem de Fundão, apresenta desafios e condicionantes diferentes daqueles que a Golder Associates teve nas avaliações preliminares de impacto realizadas em 2016 (Golder Associates, 2016a; Golder Associates, 2016b). Naquela época, os níveis de incerteza sobre os impactos eram maiores do que os atuais. Atualmente, ainda persistem diversas incertezas sobre as respostas ecológicas da biota terrestre à presença do rejeito. Por exemplo, os resultados da AER são inconclusivos quanto ao impacto sobre populações do cágado-de-barbichas (*P. geofroanus*). Por outro lado, os dados de contaminantes da AER deixam claro que os níveis de contaminantes em organismos da fauna não diferem em indivíduos coletados próximos ou distantes do rio Doce (Bicho do Mato, 2019). Além disso, as ações de reparação e manejo do rejeito estava apenas começando. De maneira geral, naquela época, foram identificados impactos genéricos relacionados essencialmente a perdas e alterações de ecossistemas, bem como a mortalidade e morbidades de organismos.

Nos últimos 5 anos, porém, além dos impactos decorrentes do rejeito liberado no colapso da barragem de Fundão, foram implementadas, e ainda serão implementadas, diversas ações de reparação e compensação, com destaque para as ações do Plano de Manejo de Rejeitos e Uso Sustentável da Terra (UST) que estão situadas, em sua maioria, dentro das ADAs e que podem afetar positiva ou negativamente a fauna e flora terrestre. Nesse sentido, para compreender os atuais impactos na fauna e flora terrestre, é importante identificar os estressores associados não apenas aos rejeitos ainda presentes nas margens e cursos d'água mas, também, os estressores associados ao Plano de Manejo de Rejeitos. Da mesma forma, os diversos usos e ocupações de solo nas ADAs e AIDs relacionados às atividades rurais e, em menor escala, urbanas, também desencadeiam uma série de impactos na fauna e flora terrestre, devendo, portanto, serem considerados na interpretação dos resultados dos programas de monitoramento. A Tabela 3 a seguir sistematiza as principais categorias de atividades e eventos, cujos estressores podem impactar a fauna e flora terrestre nas áreas de interesse.

Tabela 3: Principais categorias de atividades, estressores e impactos na fauna e flora terrestre

Categorias de Atividades/ Eventos	Principais Estressores	Principais Impactos Decorrentes dos Estressores
Rejeito liberado no colapso da barragem de Fundão	<ul style="list-style-type: none"> ● Presença de rejeito em suspensão nos cursos d'água; ● Presença de rejeito depositado na calha dos cursos d'água; ● Presença de rejeito acumulado nos solos adjacentes aos cursos d'água; ● Presença de rejeito acumulado na vegetação diretamente impactada; e ● Presença de rejeito em lagoas e reservatórios marginais. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Alterações físico-químicas e biológicas de ecossistemas terrestres; ● Mudanças de densidade em populações de espécies terrestres; ● Alteração na estrutura e composição das comunidades biológicas e dos processos ecológicos; ● Mortalidade da flora e fauna terrestre associada ao soterramento, contaminação química ou ação física do rejeito; ● Morbidade da fauna terrestre decorrente da contaminação química pelo rejeito.

Categorias de Atividades/ Eventos	Principais Estressores	Principais Impactos Decorrentes dos Estressores
Ações de reparação e compensação	<ul style="list-style-type: none"> ● Plantio de espécies nativas para restauração de APP; ● Plantio emergencial de espécies exóticas para controle de erosão; ● Construção de enrocamentos; ● Colocação de mantas geotécnicas; ● Reconformação topográfica da margem; ● Criação de áreas de remanso; ● Remoção e disposição de sedimentos nas margens; ● Remoção de sedimento das calhas (dragagem pontual); ● Criação de drenos superficiais; ● Correção de drenagem pluvial; ● Coleta de amostras de solo e água; ● Trânsito de veículos; ● Análises topográficas; ● Instalação e desativação de canteiros de obra. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Perda de habitat e de ecossistemas terrestres; ● Criação de novos habitats e de ecossistemas terrestres; ● Mudanças de densidade em populações de espécies terrestres; ● Alteração na estrutura e composição das comunidades biológicas e dos processos ecológicos; ● Mudança na conectividade dos ecossistemas terrestres; ● Alterações físico-químicas e biológicas de ecossistemas terrestres; ● Mortalidade da fauna terrestre associada ao soterramento e às concentrações elevadas de contaminantes no solo, ar e água; ● Morbidade da fauna terrestre decorrente da contaminação química do solo, ar e água.
Atividades de terceiros relacionados ao uso e ocupação do solo rural e urbano	<ul style="list-style-type: none"> ● Coleta de material lenhoso; ● Cercamento de propriedades rurais e urbanas; ● Supressão de vegetação; ● Cultivo de espécies vegetais; ● Uso de solo para pastagem de animais; ● Criação e manutenção de vias de acesso; ● Queimadas naturais e antrópicas; ● Lançamento de águas residuárias tratadas; ● Lançamento de águas residuárias não-tratadas; ● Disposição de resíduos domésticos; ● Trânsito de veículos leves e pesados; ● Presença antrópica de baixa densidade; ● Ruídos e vibrações. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Perda de habitat e de ecossistemas terrestres; ● Mudanças de densidade em populações de espécies terrestres; ● Alteração na estrutura e composição das comunidades biológicas e dos processos ecológicos; ● Criação de novos habitats e de ecossistemas terrestres; ● Mudança na conectividade dos ecossistemas terrestres; ● Alterações físico-químicas e biológicas de ecossistemas terrestres; ● Mortalidade da fauna terrestre associada ao soterramento e às concentrações elevadas de contaminantes no solo, ar e água; e ● Morbidade da fauna terrestre decorrente da contaminação química do solo, ar e água.

Conforme mostra a Tabela 3, a fauna e flora terrestre sofrem impactos não apenas decorrentes dos estressores associados à presença de rejeito no solo e cursos d'água, mas também decorrentes das diversas atividades de recuperação ambiental e, principalmente, de uso e ocupação do solo na bacia. Além disso, ainda restam duas áreas que

se sobrepõem parcialmente às ADAs e AIDs e que estão sujeitas a estressores relacionados ao lançamento de rejeitos no solo, no ar e na água: 1) o complexo minerador de Germano, que recentemente teve sua licença de operação corretiva deferida e as operações minerárias adjacentes da Vale (Timbopeba, Alegria e Fazendão); 2) a Fazenda Floresta, que quando da redação dessa proposta, estava em licenciamento ambiental para a disposição do rejeito dragado do reservatório de Candonga. Essas duas áreas têm implementado avaliações de impacto específicas, cujos programas de monitoramento de fauna e flora, diferirem do que está sendo proposto aqui. Recomenda-se que os eventuais programas de monitoramento dessas duas atividades sejam elaborados considerando os princípios descritos e os indicadores biológicos estabelecidos no presente documento.

Tendo em vista as diferentes fontes de estressores na bacia não relacionadas ao rejeito liberado no colapso da barragem de Fundão, qualquer programa de monitoramento dos impactos na fauna e flora terrestre na bacia do rio Doce, tais como mudanças de densidade de populações e mortalidade e morbidade de espécies terrestres, não podem ser relacionados ao rompimento da barragem de rejeito sem uma análise cuidadosa da cadeia causal. E, para isso, faz-se imprescindível avaliações das magnitudes proporcionais dos diversos estressores e respectivos impactos.

2.2.3 Avaliação da magnitude dos impactos persistentes e recorrentes na fauna e flora terrestre

Para o monitoramento da fauna e flora, além da identificação dos impactos nas áreas diretamente afetadas e de influência direta, é importante qualificar a magnitude desses impactos, suas abrangências espaciais e dispersões temporais. Para tal, existem diversos métodos disponíveis na literatura técnica e acadêmica, conforme ilustra a Tabela 4.

Tabela 4: Métodos que podem ser utilizados para avaliar a magnitude, abrangência espacial e dispersão temporal dos diferentes impactos na fauna e flora terrestre

Métodos	Descrição e potencial utilidade para o monitoramento da fauna e flora terrestre
Listas de verificação	Abordagem de análise sistemática dos atributos relacionados a uma lista de impactos ambientais, com base em critérios e pesos arbitrários. Para que os critérios e pesos tenham legitimidade e robustez, aconselha-se que suas definições sejam baseadas em painéis de especialistas. As listas de verificação permitem um entendimento da magnitude proporcional dos diversos impactos na fauna e flora, sendo, portanto, úteis em processos decisórios relacionados à priorização de esforços e investimentos.
Matrizes de interação	As matrizes de interação correspondem a diversos tipos de análises que buscam quantificar a interação dos estressores e seus respectivos impactos. Assim como as listas de verificação, as matrizes ajudam a entender a proporcionalidade dos impactos e suas potenciais localizações no tempo e no espaço. Todavia, são limitadas na identificação de impactos indiretos.
Sobreposição de mapas	A sobreposição de mapas corresponde a diversas técnicas computacionais (geralmente feitas nos softwares ArcGis ou Qgis) de análise multicritérios de informações espaciais e da paisagem. Assim como nas listas de verificação, para que os seus respectivos critérios e pesos tenham legitimidade e robustez, aconselha-se que suas definições se deem com base em painéis de especialistas. A sobreposição de mapas pode ser particularmente relevante para a identificação de áreas mais vulneráveis a estressores e respectivos impactos, áreas de referência e áreas aptas a recuperação ambiental.

Métodos	Descrição e potencial utilidade para o monitoramento da fauna e flora terrestre
Simulações e modelos computacionais	Trata-se de um gama variada de análises assistidas por computadores que podem ser utilizadas para modelar e inferir a magnitude e dispersões espaciais e temporais de impactos no solo, no ar e na água, bem como na fauna e flora. Assim como as sobreposições de mapas, as simulações podem ser particularmente relevantes para a identificação de áreas mais vulneráveis a estressores e respectivos impactos, áreas de referência e áreas aptas a recuperação ambiental. Porém, tais simulações são mais frequentemente utilizadas na análise de impactos com disponibilidade de dados facilmente quantificáveis.

Fonte: Descrições baseadas em diferentes autores e publicações (e.g. Leopold et al., 1971; Sorensen, 1971; Dickert & Dorney, 1974; Hopkins, 1977; Thompson, 1990; Julien et al., 1992; Morgan, 1998; Munier, 2004; Lawrence, 2007; Skutsch & Flowerdew, 2009).

Todos os quatro métodos descritos na Tabela 4 são potencialmente úteis para o aperfeiçoamento do monitoramento da fauna e flora terrestre na bacia do rio Doce. Dentre eles, as análises de sobreposição de mapas podem ser particularmente importantes no atual estágio de monitoramento dos impactos, tendo em vista que, passados mais de 5 anos do colapso da barragem de Fundão, foram geradas diversas camadas de dados geo-espacializados que permitem análise multicritérios robustas em intervalos de tempo relativamente curtos. Tais análises poderão facilitar a identificação de trechos de cursos d'água e porções territoriais mais sujeitas aos impactos persistentes e recorrentes na bacia do rio Doce, a exemplo do que ocorre na prática nacional e global de avaliação de impactos (e.g. Ramanathan, 2001; Garfi et al., 2011; Kaya & Kahraman, 2011). Podem, também, auxiliar no mapeamento de áreas de referência para o monitoramento e subsidiar as logísticas de campo e coletas de dados. No presente documento utiliza-se a abordagem de sobreposição de camadas de mapas para auxiliar na definição dos grupos de indicadores, elementos da paisagem e critérios para definição das unidades amostrais.

3. CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DE RESTAURAÇÃO NA BACIA

Para reduzir os impactos do desmatamento, a Organização das Nações Unidas (ONU) declarou que o período entre 2021 e 2030 será a década da restauração dos ecossistemas (Nações Unidas Brasil, 2019). Além disso, acordos nacionais e internacionais foram estabelecidos com o objetivo de minimizar os efeitos das mudanças climáticas pela diminuição dos gases de efeito estufa (e.g., Acordo de Paris - United Nations, 2015). No Brasil, uma das ações estabelecidas para remediar os efeitos das mudanças climáticas é a restauração de 12 milhões de hectares de florestas até 2030 (MMA, 2015). Ainda no território brasileiro, a proteção e restauração da vegetação nativa em propriedades privadas está prevista pela Lei nº 12.651 de 25 de maio de 2012, que estabelece onde e quanto de vegetação nativa deve ser protegida, recuperada ou restaurada (Rodrigues et al. 2009, Martins 2014, Brancalion et al. 2016). Seu cumprimento é fundamental para a manutenção da flora e da fauna remanescentes e para a provisão de serviços ecossistêmicos fornecidos pela vegetação, como a regulação do clima e manutenção da qualidade do solo e da água, mas esses benefícios só efetivar-se-ão com o aumento da escala da restauração (Melo et al. 2013).

O principal agente histórico de degradação da Mata Atlântica é a agricultura em grandes propriedades rurais, mas a mineração exerce, também, papel importante nessa degradação, não pela quantidade, mas pela intensidade (Guerra et

al., 2020). No entanto, muitas dessas paisagens têm passado por um processo de transição florestal, resultando numa reversão da tendência histórica de perda de cobertura florestal e dando início a uma fase de ganho de cobertura (Nanni et al. 2019).

A Mata Atlântica tem se destacado mundialmente como um dos principais 'palcos' da restauração florestal em larga escala, onde diversas regiões já apresentam um ganho líquido de cobertura florestal, tendo sido observado o ressurgimento de mais 700.000 ha de florestas nativas entre 2011 e 2015 (Crouzeilles et al. 2019), na maioria resultado de regeneração natural por abandono de áreas marginais da agricultura. Esse processo de expressão da sucessão ecológica nas áreas que foram isoladas de perturbações recorrentes oriundas do uso agrícola é intitulado de regeneração natural ou restauração passiva (Rodrigues et al. 2009b, Martins 2014, Brancalion et al. 2015). No entanto, em algumas situações da paisagem, a degradação foi mais intensa e a expressão da sucessão ecológica necessita de ações de aceleração, que envolvem tanto o preenchimento de vazios não naturalmente preenchidos, como o enriquecimento da comunidade em regeneração, pois a degradação da paisagem regional não permite a acumulação gradual de espécies (Brancalion et al 2015), o que é definido como restauração assistida (BPBES & IIS et al. 2019 a,b).

Na bacia do rio Doce, as situações que foram historicamente degradadas pela atividade agrícola, principalmente pastagem, mas nunca foram tecnicadas em termos agrícolas ou mineradas, deverão ser objeto das metodologias de restauração passiva ou restauração assistida, dependendo da intensidade dessa degradação histórica e atual nas áreas a serem restauradas e das características da paisagem regional.

Na bacia do rio Doce, incluindo o domínio espacial do PG30, em função da elevada degradação histórica da paisagem, onde sobraram poucos fragmentos naturais mais conservados, com diversidade adequada, a aplicação da metodologia de restauração passiva ficará restrita aos poucos remanescentes de formações naturais em estágio médio e avançado de regeneração (Ribeiro et al. 2009), que deverão ser isolados de ações antrópicas, para evitar o retorno à condição de estágio inicial de regeneração. No entanto, na bacia do rio Doce, a maioria dos fragmentos naturais são fragmentos em estágio inicial de regeneração, de baixa biodiversidade, estrutura comprometida e baixo provimento de serviços ecossistêmicos, geralmente por terem sido alvo de muita degradação antrópica, como fogo recorrente, extrativismo, processos erosivos, deriva de pesticidas etc.

Esses fragmentos naturais remanescentes geralmente estão invadidos por espécies exóticas agressivas (herbáceas e/ou lenhosas), que para se recuperarem adequadamente em termos de biodiversidade, funcionamento, perpetuação e provisão de serviços ecossistêmicos, necessitarão de isolamento das perturbações antrópicas futuras (fogo, extrativismo, processos erosivos e outros) e da adoção de ações de manejo adaptativo, como controle de competidores, como espécies exóticas invasoras (lenhosas e/ou gramíneas) e mesmo espécies nativas superabundantes favorecidas pela degradação, além de enriquecimento com espécies extintas ou que estão com suas populações comprometidas localmente, caracterizando então a necessidade de metodologias de restauração assistida.

Essa metodologia (restauração assistida) também será aplicada nas áreas agrícolas, principalmente pastagens, que ainda apresentam algum potencial de expressão da regeneração natural por não terem sido tecnicadas historicamente em termos agrícolas, geralmente por ocuparem ambientes declivosos ou com afloramento rochoso, que impedem a mecanização. Nessas situações, que serão isoladas das ações de degradação antrópicas futuras, a expressão de regeneração natural nessas áreas agrícolas será monitorada continuamente, até os processos ecológicos serem restaurados, orientando a adoção de ações de manejo adaptativo, como controle de competidores (espécies lenhosas e/ou gramíneas exóticas invasoras), preenchimento dos vazios não regenerados naturalmente por espécies nativas, em função de algum motivo, como erosão ou intervenção antrópica intensa naquele trecho, o que é chamado de adensamento, e também da necessidade de enriquecimento dessas áreas em restauração com espécies extintas ou

comprometidas localmente (Rodrigues et al. 2009a,b; Martins 2014, Brancalion et al. 2015;BPBES & IIS et al. 2019 a,b).

No entanto, as situações da bacia do rio Doce, incluindo o domínio espacial do PG 30, que foram historicamente e atualmente mais tecnificadas, em termos agrícolas, ou foram mineradas, ou receberam depósito de rejeito, se caracterizam pela baixa resiliência ecológica, sem expressão da regeneração natural e sua recuperação demanda adoção de metodologias de restauração ativa, como o plantio total de sementes e/ou mudas (Rodrigues et al. 2009, Brancalion et al. 2015, BPBES & IIS et al. 2019 a,b). No entanto, esse método é o de maior probabilidade de insucesso, além de apresentar elevado custo de implantação e manutenção (Rodrigues et al. 2009a,b; Brancalion et al. 2019) e portanto, necessita de aperfeiçoamentos técnicos mais eficientes e menos onerosos (Brancalion et al. 2015). Nesse contexto, grupos funcionais de plantas, que são amplamente utilizados na ecologia de comunidades para descrever a variação de características dentro e entre as comunidades das plantas (Lavorel et al. 2012; Diaz & Cabido 2001) têm sido, também, utilizados em restauração ecológica, com objetivo de maior custo eficiência, sendo que o agrupamento de plantas é definido de acordo com suas características funcionais, diferente do passado, onde as espécies eram selecionadas de acordo com seu grupo sucessional (Pacto, 2009; Rodrigues et al. 2011; BPBES & IIS et al. 2019a,b).

No Brasil, que é referência mundial em restauração florestal, os plantios de restauração ativa têm utilizado espécies nativas regionais com atributos funcionais que conferem a essas espécies rápido crescimento e boa cobertura do solo, denominadas de espécies de recobrimento, responsáveis pela estruturação da comunidade florestal, combinadas com espécies de diversidade, que todas espécies nativas regionais de todos os grupos sucessionais, inclusive as espécies pioneiras que não promovem boa cobertura do solo, com excessão das espécies de recobrimento (Brancalion et al. 2015). As espécies de recobrimento têm a função de restaurar a estrutura inicial da floresta rapidamente e por isso são escolhidas algumas espécies iniciais da sucessão e não todas as pioneiras, pois a maioria das pioneiras apenas tem crescimento rápido, mas não promovem a cobertura do solo e a estruturação da floresta (Rodrigues et al. 2009a,b; Brancalion et al. 2015). Já as espécies de diversidade são as responsáveis pelo funcionamento da comunidade florestal, como consolidação do dossel, densidade e diversidade de regenerantes, atração de polinizadores e dispersores, de outras interações, e, até mesmo, de acumulação de espécies de outras formas de vida, etc (Brancalion et al. 2015; BPBES & IIS et al. 2019 a,b).

As espécies de recobrimento são aquelas de rápido crescimento e que apresentam copas perenes, densas e amplas, possibilitando uma rápida cobertura do solo e permitindo, assim, o controle de gramíneas exóticas agressivas, que é um dos principais *drives* de insucesso da restauração florestal (Rodrigues et al. 2009a,b; Brancalion et al. 2011). Em contrapartida, espécies de diversidade seriam aquelas que não apresentam tais restrições, tendo distintos ciclos de vida, sendo essenciais para garantir a perpetuação da área em restauração, uma vez que ao longo do processo, essas espécies de diversidade devem substituir as espécies de recobrimento (Brancalion et al. 2015). As espécies de recobrimento, apesar de crescerem rápido e promoverem boa cobertura do solo, isso não ocorre no curtíssimo prazo, e para aumentar ainda mais a eficiência na contenção de gramíneas exóticas invasoras, essas espécies têm sido consorciadas com espécies comerciais utilizadas para adubação verde (BIOFLORA 2015; Beltrame & Rodrigues 2007; Vieira 2017), aumentando o sucesso e reduzindo o custo da restauração. Até esse momento, os três grupos (adubação verde, recobrimento e diversidade) são plantados no mesmo tempo, definido como técnica de plantio não escalonado, na metodologia de restauração ativa (Brancalion et al. 2015).

No entanto, como as comunidades vegetais se desenvolvem em estados alternativos de composição de espécies, o estabelecimento de uma comunidade pode ser modulado pelos organismos que chegam primeiro ao sistema (Fukami 2015). Esse processo é chamado de efeito de prioridade (*priority effect*), nos quais as plantas que chegam primeiro a um local podem afetar positiva ou negativamente o estabelecimento, crescimento e reprodução das espécies que se estabelecem depois, influenciando assim o processo de sucessão e montagem da comunidade (Fukami 2015; Temperton

et al. 2016; Weidlich et al. 2017). Desta forma, os efeitos de prioridade podem afetar a estrutura e a composição de uma comunidade e, conseqüentemente, influenciar as funções e os serviços ecossistêmicos. Esses efeitos são relevantes no contexto da restauração ecológica, os quais podem manipular a ordem de plantio de espécies ou de grupo funcionais guiando a trajetória da comunidade vegetal a ser restaurada para um objetivo desejado (Young et al., 2017; Wilsey, 2020). Nesse sentido, a restauração ativa tem evoluído, também, para plantio escalonado dos grupos funcionais, criando primeiro a estrutura florestal com as espécies de recobrimento, consorciadas com a adubação verde, para depois essa estrutura florestal, que foi recentemente criada, ser enriquecida com as espécies da diversidade (Brancalion et al. 2015).

Na bacia do rio Doce, incluindo o domínio espacial do PG30, nas áreas muito degradadas pela tecnificação agrícola, geralmente planas ou passíveis de mecanização, as áreas mineradas e as áreas com depósito de rejeito resultante do rompimento da barragem, estão sendo e deverão ainda ser objeto de restauração ativa. Para tanto, são empregadas técnicas variadas de plantio escalonado ou não escalonado, com mudas e/ou sementes (semeadura direta), mas sempre consorciadas com adubação verde, dependendo do tamanho da área a ser restaurada, da possibilidade ou não de mecanização, da facilidade de acesso, da dominância de gramíneas exóticas agressivas e da característica agrícola e cultural do proprietário rural (Brancalion et al. 2015). Como exemplo disso, a Tabela 5 exemplifica a adequação dos métodos e técnicas de restauração ecológica para cada situação de degradação da bacia do rio Doce, considerando seu uso agrícola histórico e atual, que define o potencial de regeneração natural, a possibilidade ou não de mecanização e a facilidade ou não de acesso e outras, na perspectiva de potencializar o sucesso dessas ações de restauração.

Tabela 5: Exemplo das metodologias e técnicas mais adequadas de restauração ecológica para cada situação de degradação da bacia do Rio Doce, considerando suas características intrínsecas, visando potencializar sucesso das ações.

Descrição das possíveis situações de restauração ecológica na Bacia do Rio Doce	Metodologia e técnica de restauração ecológica mais recomendada para cada situação de degradação	Observações importantes para contextualizar recomendação
<p>1- Pastagens com regeneração natural (em quantidade de regenerantes e de espécies suficientes para garantir restauração ecológica com sucesso)</p>	<p>Restauração passiva (metodologia), onde a área vai apenas ser isolada de perturbações antrópicas.</p>	<p>A restauração passiva deverá ser a mais rara na bacia, pelas características de degradação da paisagem, sendo definida apenas para as situações onde a regeneração natural permitirá restaurar indicadores com valores comparáveis aos ecossistemas de referência.</p>
<p>2- Pastagens com regeneração natural (em quantidade de regenerantes e de espécies insuficientes para garantir restauração ecológica com sucesso)</p>	<p>Restauração assistida (metodologia) através da condução da regeneração natural, adensamento (vazios não regenerados naturalmente) e enriquecimento (diversidade) (técnica).</p>	<p>A restauração assistida deverá ser a mais comum na bacia, pelas condições fisiográficas e de degradação da paisagem, sendo a mais apropriada para essas condições por permitir reduzir custo aproveitando a regeneração natural, mas que deverá ser adensada e enriquecida com novas espécies.</p>

Descrição das possíveis situações de restauração ecológica na Bacia do Rio Doce	Metodologia e técnica de restauração ecológica mais recomendada para cada situação de degradação	Observações importantes para contextualizar recomendação
3- Pastagem sem regeneração natural, pequenas ou grandes áreas, mecanizáveis ou não , de difícil acesso	Restauração ativa (metodologia) através do plantio de mudas de espécies de recobrimento e mudas de espécies de diversidade, não escalonado (técnica)	O plantio de mudas não escalonado foi definido como mais apropriado por exigir menor tempo de acompanhamento, já que a área não tem presença constante do proprietário.
4- Pastagem ou áreas agrícolas sem regeneração natural, em larga extensão, não mecanizáveis e de fácil acesso	Restauração ativa (metodologia) através do plantio de mudas de espécies de recobrimento e mudas de espécies de diversidade, escalonado de spp de recobrimento e diversidade (técnica).	O plantio de mudas escalonado foi definido como mais apropriado pelo fato da situação não permitir mecanização, mas permitir (plantio escalonado) rápida ocupação e controle das gramíneas exóticas agressivas.
5- Áreas agrícolas ou pastagens (pequenas ou grandes), sem regeneração natural, não mecanizáveis , mas de difícil acesso	Restauração ativa (metodologia) através do plantio de mudas de espécies de recobrimento e mudas de espécies de diversidade, não escalonado (técnica).	O plantio de mudas escalonado foi definido como mais apropriado pelo fato da situação não permitir mecanização e ser de difícil acesso, não permitindo retornos constantes.
6- Pastagem ou áreas agrícolas (pequenas ou grandes), sem regeneração natural, mecanizáveis , de fácil acesso	Restauração ativa (metodologia) através do plantio de sementes de espécies de recobrimento e mudas de espécies de diversidade, escalonado de spp de recobrimento e diversidade (técnica).	O plantio de sementes de recobrimento e mudas de diversidade (spp de sementes pequenas) foi definido como mais apropriado por garantir rápida ocupação com baixo custo, mas com sustentabilidade.
7- Outras possíveis situações de restauração ecológica.	Sistemas Agroflorestais ou restauração com fins econômicos	Os SAFs estão sendo recomendados para APPs de pequenos proprietários rurais (não madeireiros) e para restauração de RL de médios e grande proprietários rurais

Na bacia do rio Doce, incluindo o domínio espacial do PG30, a restauração (passiva, assistida e ativa) já realizada e a planejada não promoverá a regularização legal (regularização para as áreas de preservação permanente e para reserva legal) de todas as propriedades rurais da bacia do Rio Doce na legislação ambiental vigente (Brasil 2012), sendo que isso irá acontecer apenas para uma pequena fração das propriedades da bacia. Mesmo que a Fundação Renova se programasse em promover a regularização ambiental de todas as propriedades da bacia, essa regularização não necessariamente atenderia aos critérios científicos para o restabelecimento de corredores ecológicos na bacia, interligando, através da restauração ecológica, os fragmentos naturais remanescentes (Rother et al. 2018). Para que isso ocorresse em todas as propriedades da bacia, assim como está ocorrendo em algumas propriedades dos PG 17 e 40, seria necessário um bom planejamento espacial da propriedade, integrando a área ambiental (APP e RL) com a área agrícola, permitindo a restauração ecológica principalmente nas áreas agrícolas de baixa aptidão e preservando as áreas agrícolas de maior aptidão para produção tecnificada e de elevada produtividade, a fim de evitar conflito entre o tema ambiental e agrícola (Latawiec et al. 2016). Além disso, até o momento, as restaurações ecológicas já implantadas nas

propriedades rurais da bacia do rio Doce, com algumas poucas exceções dos PG 17 e 40, não foram planejadas para potencializar o provimento de serviços ecossistêmicos da bacia, como por exemplo, aumentar a proteção do solo de maior potencial de infiltração (Lozano-Baez et al. 2020), potencializar a disponibilização de polinizadores de culturas agrícolas da bacia (Montoya-Pfeiffer et al. 2020; BPBES & IIS et al. 2019 a,b) e outros, que estão sendo propostos para serem ainda incorporados nas restaurações ecológicas que estão planejadas na bacia do Rio Doce, mas ainda não executadas. Vê-se abaixo mapas (Figura 6, Figura 7, Figura 8, Anexo 2) com fragmentos naturais remanescentes e trechos com restauração executada e prevista. Os mapas apresentam: (1) fragmentos naturais remanescentes, que serão alvo de restauração passiva ou assistida, dependendo do estágio de regeneração (passiva no médio e avançado e assistida no inicial); (2) trechos já restaurados ou que ainda serão restaurados usando metodologia de restauração assistida nos trechos nunca tecnificados em termos agrícolas, por impedimento de mecanização e; (3) trechos que já foram ou serão restaurados usando restauração ativa, por não apresentarem mais expressão da regeneração natural, em função da intensa degradação por uso agrícola histórico conforme definições dos Programas 25 e também dos PG 26 e 27 da Fundação Renova.

Figura 6: Mapa do domínio espacial do PG30 - Trecho 1

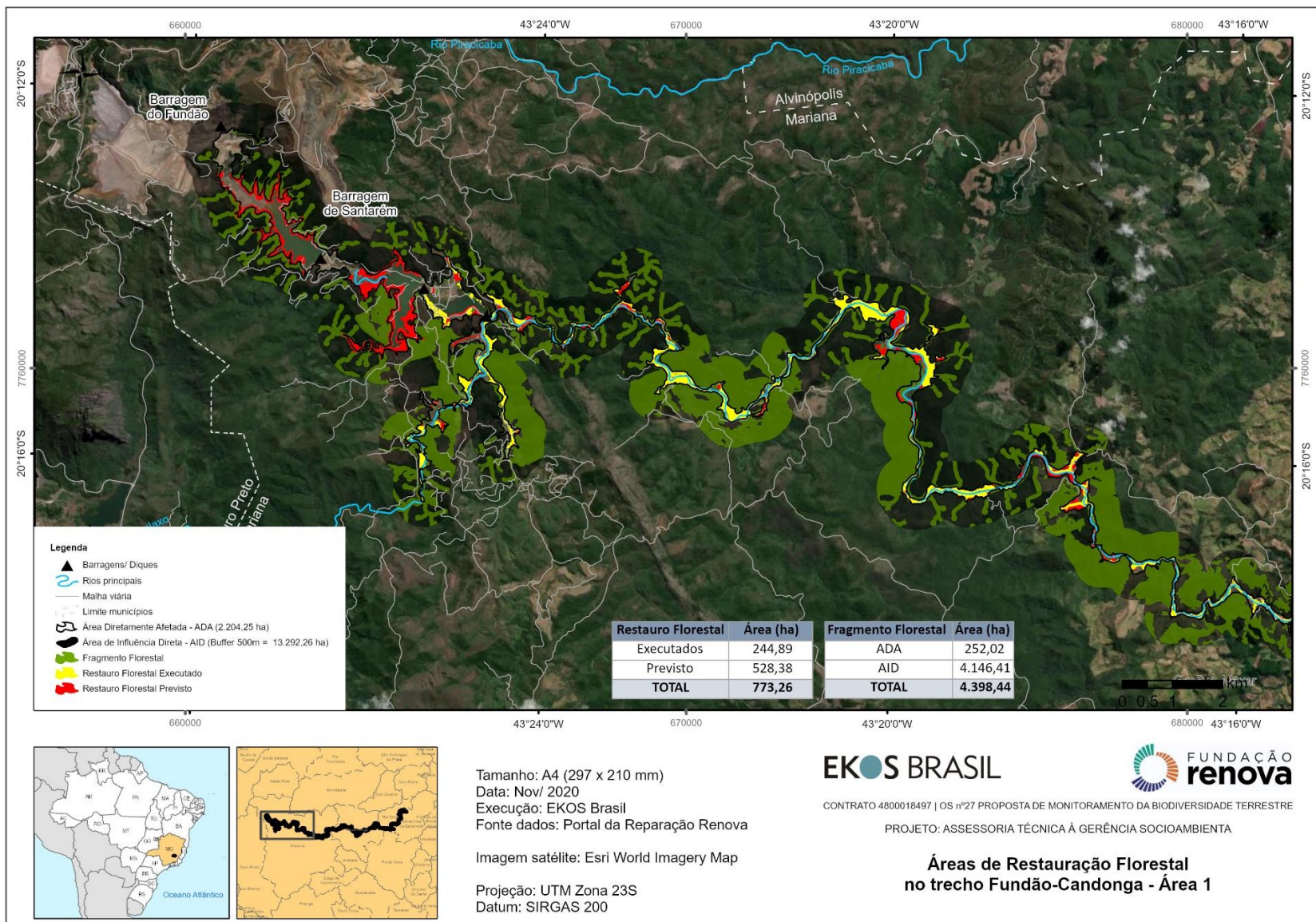


Figura 7: Mapa do domínio espacial do PG30 - Trecho 2.

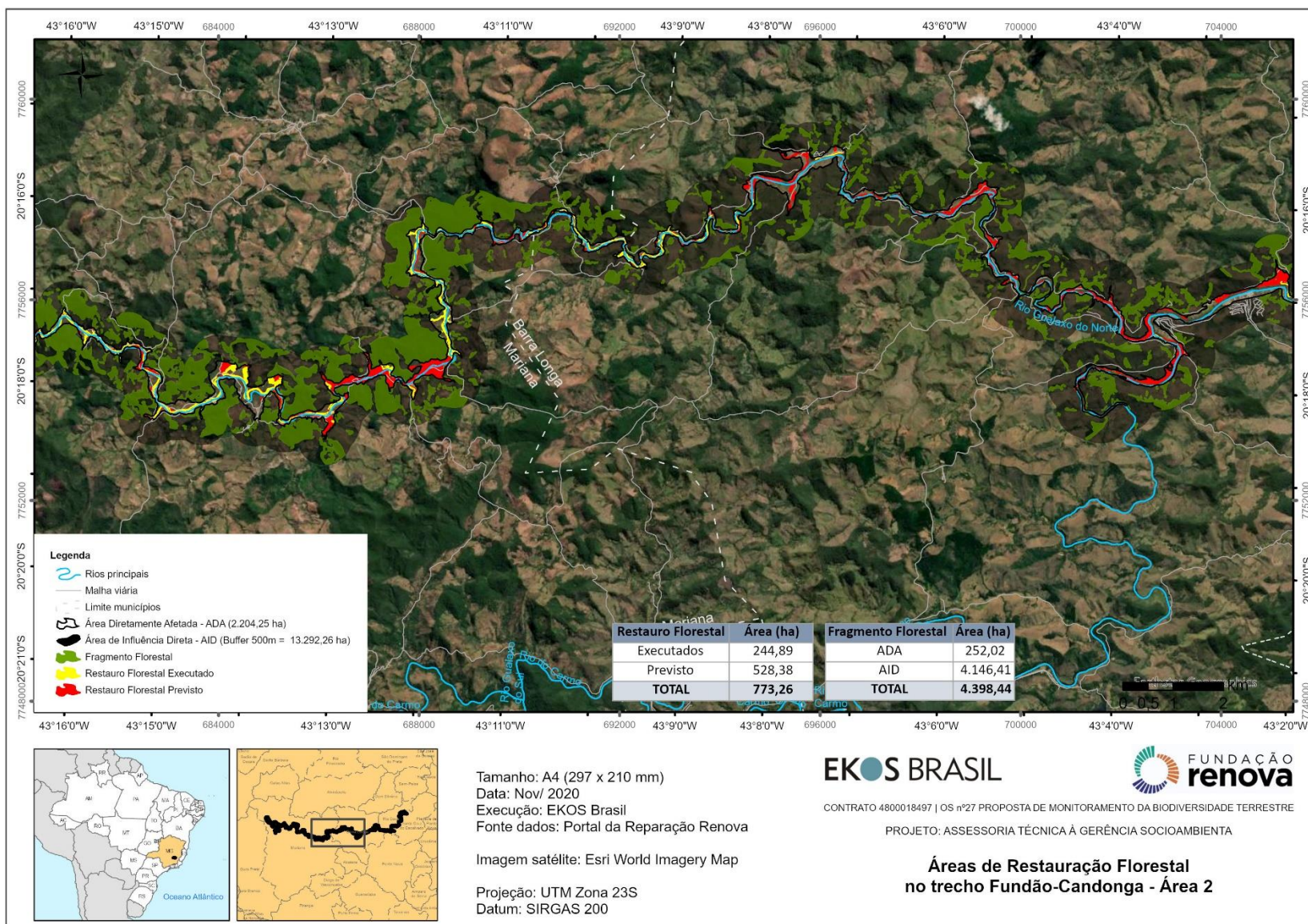
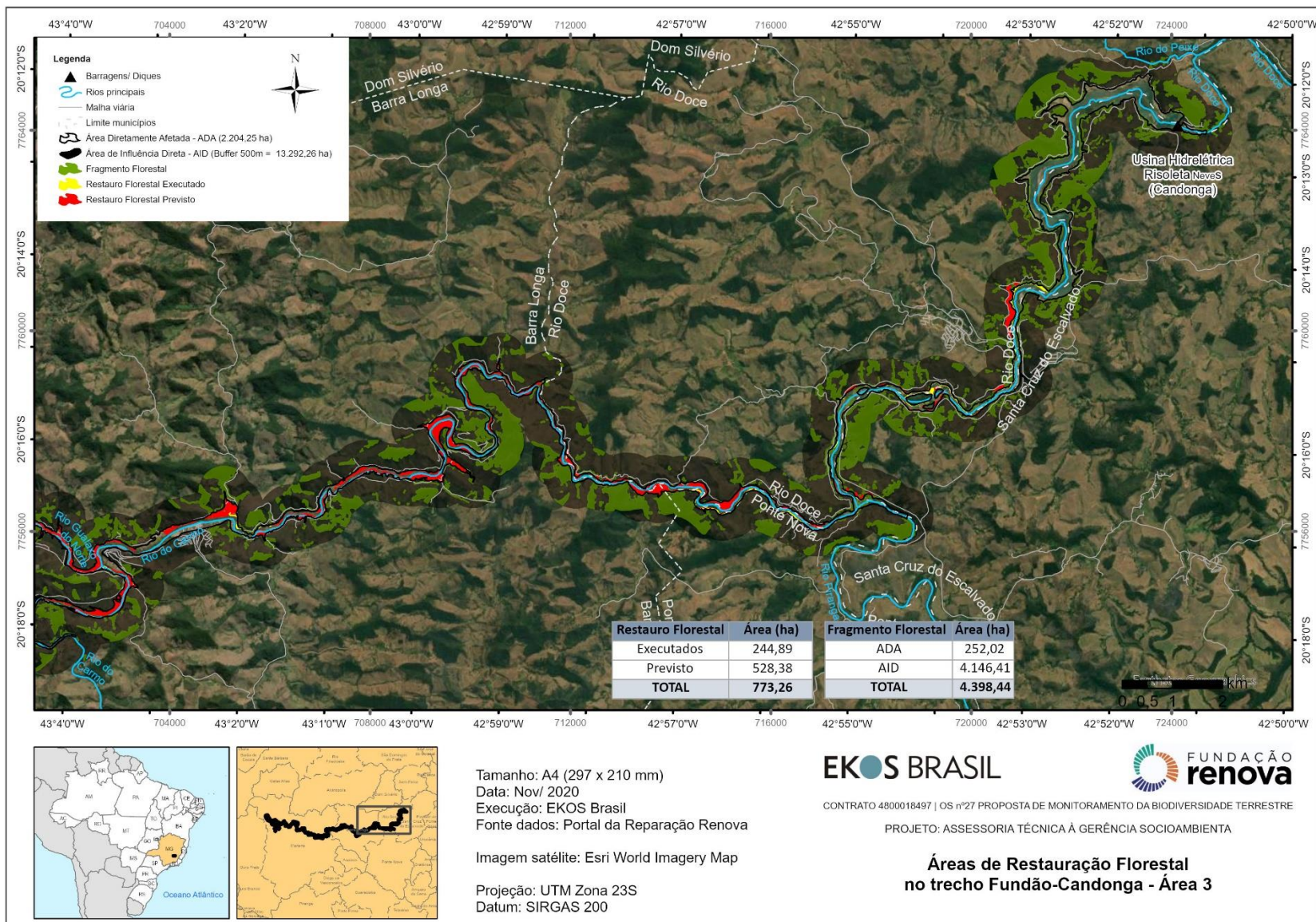


Figura 8: Mapa do domínio espacial do PG30 - Trecho 3.



4. DEFINIÇÃO DA MALHA AMOSTRAL

O conceito da malha amostral desse projeto prevê que se deve compatibilizar ao máximo as áreas de amostragem para todos os grupos. Diversos estudos recentes têm mostrado que a abordagem de múltiplos táxons permite discriminar muito mais eficientemente entre as diferentes fontes de impactos e a resposta geral da comunidade (Gardner et al. 2013; Silveira et al. 2015; Solar et al. 2015; Barlow et al. 2016; Leal et al. 2020). Neste sentido, propõe-se que o foco principal da malha amostral sejam paisagens ao longo da bacia.

Dadas as seis premissas que foram adotadas para o monitoramento, são explicitados agora a lógica e os critérios utilizados para determinação dos sítios amostrais. Este produto indica três malhas amostrais especializadas. São elas: uma malha amostral para o monitoramento do impacto dos rejeitos; uma malha amostral para monitoramento da restauração; e uma malha para amostragem dos organismos com características biológicas específicas (*Phrynosps*, *Hydromedusa*). Para cada malha amostral foram definidos um conjunto de critérios para seleção dos sítios de amostragem (Figura 1, mais detalhes abaixo).

4.1. MALHA AMOSTRAL PARA MONITORAMENTO DOS IMPACTOS DA DEPOSIÇÃO DO REJEITO

A malha para monitoramento do impacto crônico dos rejeitos é modular. O primeiro módulo é o conjunto de fragmentos florestais no trecho entre Fundão e a UHE Risoleta Neves. O segundo módulo compreende as ilhas fluviais no rio Doce. Por fim, o terceiro módulo são as restingas na foz do rio Doce.

Para a seleção das unidades amostrais no primeiro módulo foi adotada uma abordagem analítica de priorização dos fragmentos. Utilizou-se para isso o processo analítico hierárquico (AHP, da sigla em inglês para *analytic hierarchy process*). A indicação das unidades amostrais nas ilhas fluviais baseou-se nos estudos já realizados durante a Avaliação Ecológica Rápida, considerando também acessibilidade e tamanho da ilha. Por fim, para as unidades amostrais nas áreas de restinga foi utilizada a lista de restingas amostradas no monitoramento da biodiversidade aquática no âmbito do PG28. Para definição final da malha amostral cinco etapas devem ser percorridas, sendo que as duas últimas são posteriores à entrega desse produto. As etapas são:

(1) Priorização dos fragmentos florestais (sítios amostrais): conduziu-se uma AHP (ver abaixo) para determinar a elegibilidade de áreas ao longo do trecho barragem de Fundão – UHE Risoleta Neves. As áreas elegíveis foram divididas entre:

4. (1.a) Porções de Fragmentos Alvo: Fragmentos florestais, ou parte destes, que originalmente foram direta ou indiretamente atingidos e estiveram ou estão em contato com o rejeito e como áreas intermediárias dentro de um *buffer* de 300m em relação à ADA;
5. (1.b) Fragmentos de Referência: Fragmentos florestais em condições ambientais similares às áreas alvo, que representam o histórico da região, mas que não foram impactados diretamente pelo rejeito e que estão fora da área de influência direta do rejeito e das ações da Fundação Renova – fora do *buffer* de 500 m em relação à ADA.

(2) Espacialização e avaliação da representatividade: os sítios amostrais devem permitir uma cobertura amostral adequada; representar as condições da bacia (geologia, conservação, relevo, uso e ocupação do solo); e garantir a independência entre os pontos.

(3) Indicação de sítios fora do trecho Fundão-UHE Risoleta Neves: indicação das ilhas localizadas ao longo do rio Doce e as áreas de restinga localizadas na foz do rio, no Espírito Santo, a fim de se verificar os possíveis impactos de contaminantes trazidos pela mancha de rejeitos.

(4) Validação dos sítios amostrais em solo: A indicação dos sítios foi feita a partir de mapas e arquivos de sensoriamento remoto. Todos os sítios indicados, todavia, devem passar por uma fase de validação futura em campo, quando deverão ser avaliados aspectos como acesso, autorização de coleta pelos proprietários, confirmação do estágio de sucessão e perturbação da área, dentre outros detalhados em tópico específico.

(5) Validação das parcelas permanentes: após a validação em solo dos sítios amostrais, é necessária uma última etapa em que a Fundação Renova deverá avaliar e validar as áreas de parcelas permanentes. Como as parcelas serão amostradas e monitoradas sistematicamente durante o número de anos proposto para cada grupo, é necessária uma análise por parte da Fundação Renova com vistas a garantir o bom andamento do monitoramento.

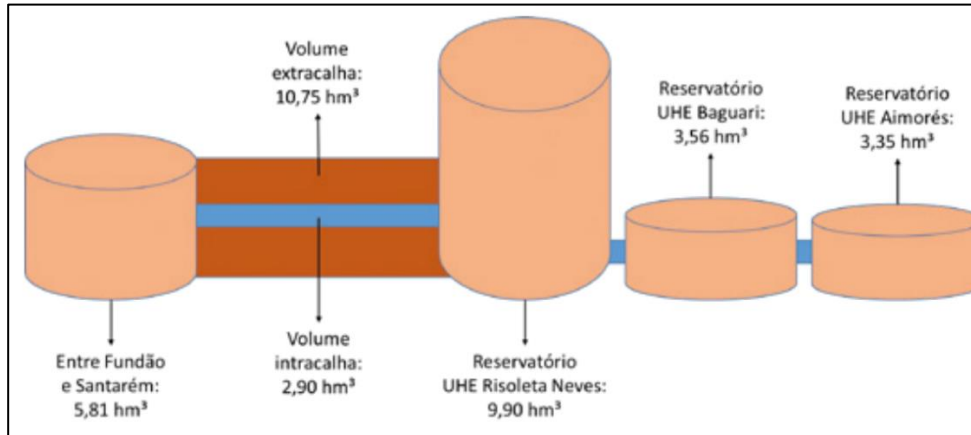
A equipe propõe que a malha amostral para entendimento do impacto do rejeito no trecho Fundão – UHE Risoleta Neves seja composta por um total de 40 sítios amostrais. Estes sítios consistirão em 40 fragmentos de vegetação natural, em estágio médio ou avançado. Deste total, 20 sítios deverão ser alocados em porções de Fragmentos Alvo (FA), ou seja, aqueles que estejam em contato com o rio ou que estiveram em contato com a faixa de deposição do rejeito. Outros 20 fragmentos deverão ser amostrados como condição de referência (FR), ou seja, que representam a complexidade do trecho da bacia, porém sem contato com o rio e fora da faixa de deposição de rejeito.

Para os sítios amostrais fora do trecho Fundão – UHE Risoleta Neves a proposta é que cinco ilhas fluviais e seis áreas de restinga, localizadas a diferentes distâncias da foz do rio Doce, sejam amostradas para avaliação do impacto de contaminantes sobre a fauna de vertebrados terrestres.

4.1.1. Priorização de fragmentos florestais no trecho Fundão – UHE Risoleta Neves usando o processo analítico hierárquico (AHP)

O rompimento da barragem de Fundão, no dia 5 de novembro de 2015, resultou na liberação de um volume estimado de 44 milhões de m³ de rejeitos sobre os córregos Fundão e Santarém e os rios Gualaxo do Norte, do Carmo e Doce. Parte desse rejeito ficou retido nas calhas e margens dos rios; parte foi transportado por mais de 650 km até atingir, no dia 21 de novembro de 2015, a costa do Espírito Santo, dispersando-se no mar a partir da foz do rio Doce. A disposição do rejeito ao longo da bacia não se deu de forma homogênea. Os estudos da Lactec (2020) revelaram que quase 70% do rejeito (29,36 hm³) ficou retido no trecho entre a barragem de Fundão e o reservatório da UHE Risoleta Neves. Deste volume, cerca de 10,75 hm³ (cerca de 25% do rejeito originalmente contido da barragem de rejeito de Fundão) ficou depositado fora da calha dos rios (Figura 9), tendo impactado diretamente a flora e a fauna terrestre no trecho Fundão-UHE Risoleta Neves.

Figura 9: Principais volumes de rejeito depositados ao longo da bacia do Rio Doce



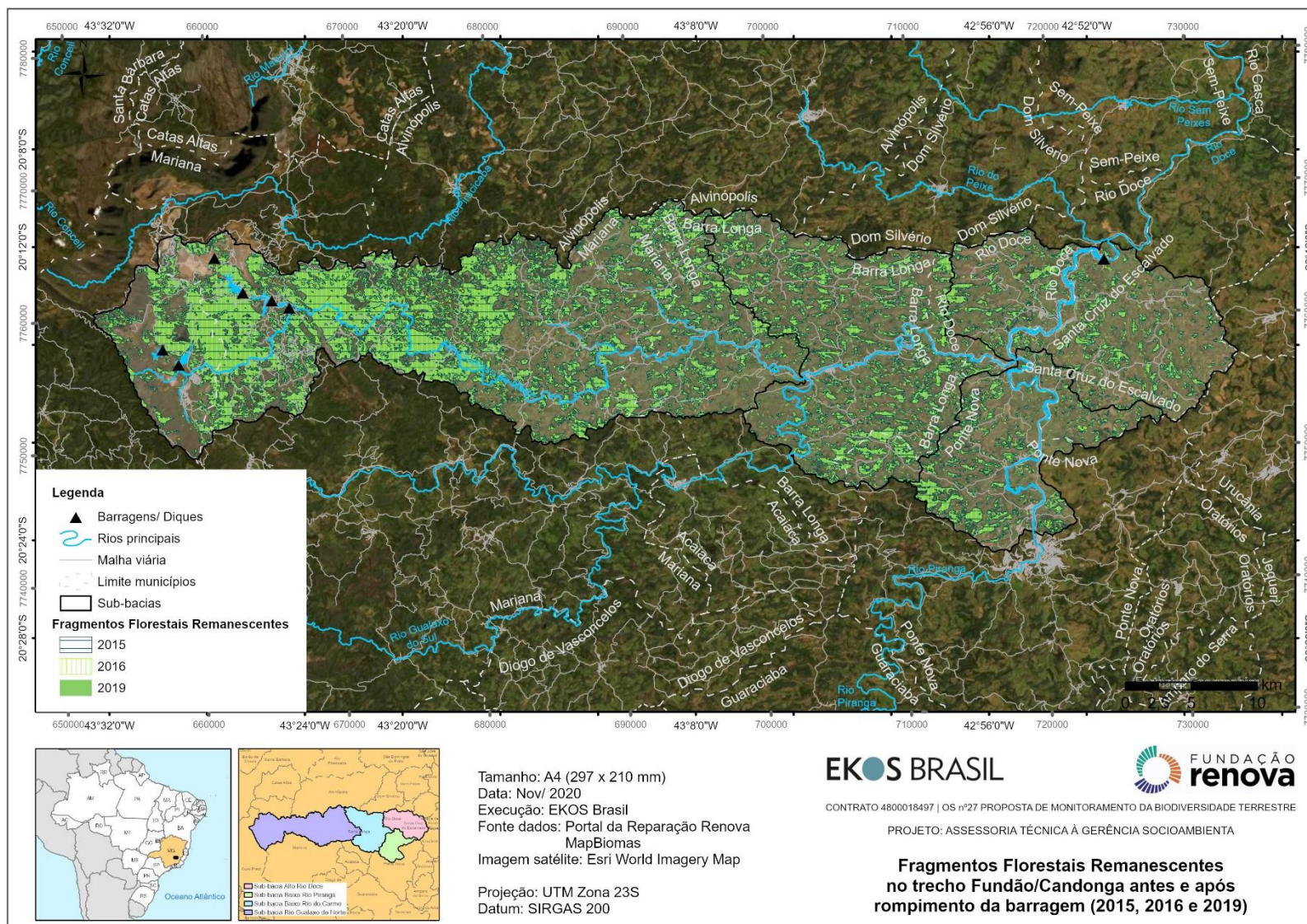
Fonte: Lactec (2020, p. 229)

O trecho Fundão-UHE Risoleta Neves da bacia do rio Doce é, portanto, o trecho mais relevante para o entendimento dos impactos crônicos persistentes do rejeito na biodiversidade terrestre. Todavia, esse trecho perpassa 4 sub-bacias hidrográficas (Gualaxo do Norte, Carmo, Piranga e Alto Doce) cujas áreas (acumuladamente cerca de 113 mil hectares) possuem bastante heterogeneidade de uso e ocupação do solo. As propriedades que foram impactadas pelo rejeito incluem áreas rurais, urbanas, industriais, de culturas agrícolas e pastagem, bem como áreas com vegetação nativa em diferentes estados de conservação. Ao longo dos últimos 5 anos, a Fundação Renova também implantou diversas técnicas de recuperação de áreas degradadas, por meio de serviços de drenagem, terraplenagem, reconformação topográfica, plantio direto de mudas nativas e condução de regeneração natural da vegetação com e sem enriquecimento.

Em contextos de alta variação na paisagem, como é o caso dessas sub-bacias do trecho Fundão-UHE Risoleta Neves, recomenda-se a adoção de desenhos amostrais em blocos, conforme recentemente salientou a Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável - FBDS (2020). Tais blocos devem espelhar porções da paisagem que sofreram impactos diretos e indiretos (monitoramento ALVO), bem como porções que podem servir de referência para a interpretação dos resultados monitorados (monitoramento de REFERÊNCIA). E, no caso de monitoramento de diversos grupos de fauna e flora, os fragmentos florestais, sobretudo aqueles em estágio médio e avançado, tendem a oferecer as melhores condições para abrigar tais blocos amostrais.

As centenas de fragmentos florestais das 4 sub-bacias do trecho Fundão-UHE Risoleta Neves (Figura 10, Anexo 3) estendem-se, de forma fragmentada, por uma área de mais de 37 mil ha, conforme dados recentes do MapBiomas (2020). De maneira geral, os fragmentos maiores estão situados nas maiores altitudes e nas cabeceiras dos cursos d'água. Todavia, os fragmentos apresentam grande variedade de declividade e de condições de acesso e proximidade a cursos d'água, situação que impõe a necessidade de se estabelecer critérios claros e objetivos para selecionar os fragmentos que serão contemplados no plano de monitoramento da biodiversidade terrestre.

Figura 10: Fragmentos Florestais Remanescentes no trecho Fundão/Candonga antes e após o rompimento da barragem de Fundão (2015, 2016 e 2019)



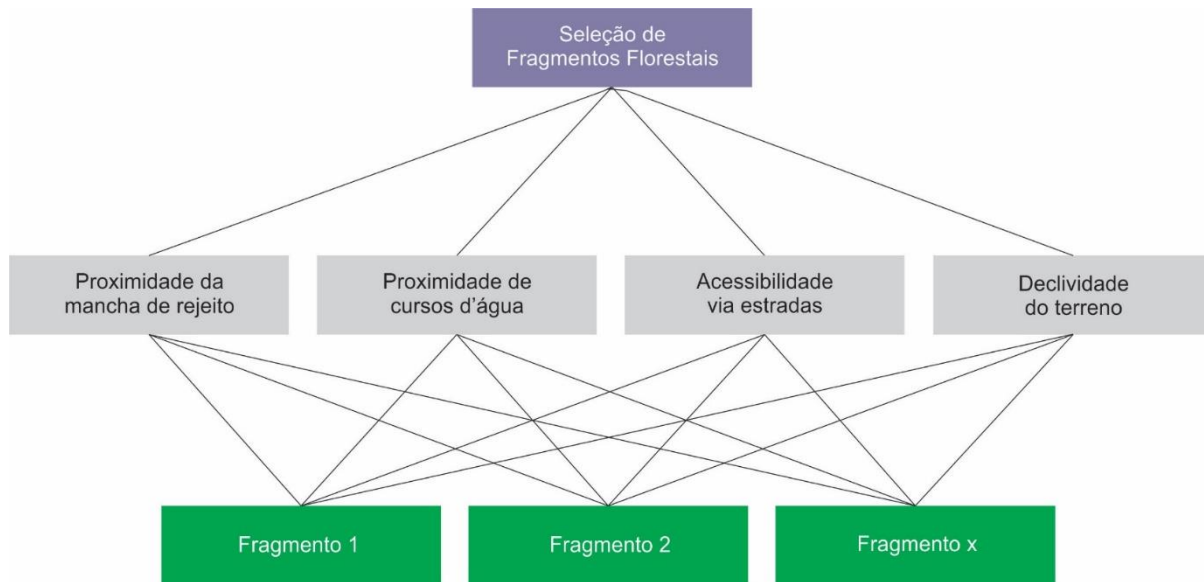
Conforme salientou a seção 2.2.3 deste documento, dentre as diversas técnicas de avaliação de impacto, “(...) as análises de sobreposição de mapas podem ser particularmente importantes no atual estágio de monitoramento dos impactos” tendo em vista a existência de “(...) diversas camadas de dados geoespacializados que permitem análise multicritérios robustas em intervalos de tempo relativamente curtos”. Dentre as técnicas de sobreposição de mapas que podem ser úteis para o estabelecimento de áreas prioritárias para o monitoramento dos impactos persistentes na fauna e flora destaca-se o processo analítico hierárquico, que é mais conhecido na terminologia da língua inglesa, i.e., *analytic hierarchy process* (AHP).

A técnica AHP foi concebida por Saaty (1977) na década de 1970 e tem sido, desde então, extensivamente aplicada a diversos problemas de gestão socioambiental, sobretudo em ambiente de sistema de informação geográfica (SIG). A AHP é útil em situações nas quais tomadores de decisão lidam com alternativas de importâncias distintas e que podem ser classificadas e priorizadas. Além disso, a AHP propicia tomadas de decisão de maneira transparente, objetiva e rastreável, minimizando vieses de equipe e facilitando adaptações em caso de interrupção de programas ou de perda de dados (Ramanathan, 2001, Saaty, 1987).

Para a priorização dos fragmentos florestais que podem acomodar a malha amostral do monitoramento da biodiversidade terrestre no trecho Fundação-UHE Risoleta Neves foi implementada uma AHP em ambiente SIG seguindo o modelo tradicional de análises de pares de alternativas, na qual um grupo de especialistas julga as importâncias e pesos relativos das alternativas. No caso em questão, os especialistas constituem a equipe do Instituto Ekos Brasil que participou da elaboração deste relatório.

A AHP foi executada no software QGIS 3.4.8-Madeira utilizando dados públicos (limites sub-bacias, fragmentos florestais levantados pela FBDS em 2013, declividade baseada em ALOS/PALSAR/12,5m, hidrografia, malha viária do OpenStreetMap) bem como dados da Fundação Renova (mancha de rejeitos, dados de uso e ocupação do solo na área direta e indiretamente afetada, e técnicas de restauração florestal) com base no sistema de referência de coordenadas (SRC) SIRGAS 2000 UTM Zone 23. O objetivo principal da AHP foi classificar o nível de aptidão dos fragmentos florestais para o monitoramento da flora e fauna terrestre, com base em 4 critérios principais, conforme mostra a Figura 11.

Figura 11: Principais critérios utilizados na AHP para a classificação da aptidão dos fragmentos florestais



Fonte: Elaborado pela equipe Ekos Brasil.

A equipe de especialistas entendeu que os fragmentos florestais em contato direto ou indireto com o rejeito depositado nas margens dos rios (critério 1), seriam aqueles preferíveis para o monitoramento ALVO, ou seja, para o monitoramento dos fragmentos nos quais ocorrem mais claramente os impactos crônicos persistentes na fauna e flora terrestre. Da mesma forma, os fragmentos florestais situados próximos à mancha de rejeito, mas sem contato direto ou indireto com o mesmo foram considerados preferíveis para acomodar o monitoramento de REFERÊNCIA, tendo em vista que esses fragmentos tendem a ter atributos ecológicos similares aos dos fragmentos que abrigarão o monitoramento ALVO.

Na AHP, trabalhou-se com um *buffer* mais conservador de 300 metros para garantir que o monitoramento ALVO seja capaz de detectar relações causais entre o rejeito e a fauna e flora terrestre. Porém, para a localização do monitoramento de REFERÊNCIA, deve-se selecionar os fragmentos localizados fora da AID (a partir de um *buffer* de pelo menos 500m da ADA), para garantir que os dados não reflitam os impactos do rejeito. Cumpre salientar que existe uma relação de *trade-off* (troca de atributos desejáveis) para a delimitação das áreas de influência indireta. A adoção de AIDs maiores, da ordem de quilômetros de distância da ADA, como ocorreu em trabalhos anteriores (Golder Associates, 2016), embora facilite a identificação de resquícios de impactos de menor magnitude na fauna e flora, geram AIDs com muita diversidade na paisagem, cobrindo diferentes subbacias hidrográficas e atributos ecológicos, situação que pode dificultar a interpretação do monitoramento de referência.

A equipe de especialistas também julgou que seria desejável que os fragmentos estivessem próximos aos cursos d'água (critério 2), e, do ponto de vista da acessibilidade para as coletas de campo, que os fragmentos estivessem em áreas de baixa declividade (critério 4) nem muito próximas nem muito distantes de estradas de rodagem (critério 3). Os valores específicos dos limites de distância e os respectivos pesos desses 4 critérios foram deliberados pelos especialistas, da seguinte maneira:

- Proximidade da mancha de rejeito: Próximo (<3500m, peso 5), Meio-termo (3500m<x < 7000m, peso, 3) e Distante (>7000m, peso 2);
- Distância de cursos d'água: Próximo (<100m, peso 5), Meio-termo (100<x < 300, peso 3) e Distante (>300, peso 2);
- Acessibilidade via estradas de rodagem: Indesejavelmente próximo (<150m, peso 1), Distância Ideal (150<x < 1000, peso 6) e Indesejavelmente Distante (>1000, peso 3); e
- Declividade do terreno: Baixa declividade (<10%, peso 6), Declividade média (10%<x <45%, peso 3) e Muito íngreme (>45%, peso 1).

Em seguida, os especialistas julgaram a importância relativa dos critérios utilizando, para tal, a escala de 9 níveis de prioridade relativa do método AHP desenvolvida por Saaty (1977), que varia de igualmente preferido (valor 1) a extremamente preferido (valor 9). Os julgamentos das importâncias relativas, explicitados na Tabela 6, tiveram um coeficiente de consistência de 9%, valor que é inferior ao recomendado por Saaty de 10%.

Tabela 6: Julgamento dos especialistas, conforme escala AHP, da importância relativa dos critérios

Critérios	Juízo de preferência		Critérios
Proximidade da mancha de rejeito	7x	mais preferível que...	Proximidade de cursos d'água
Proximidade de cursos d'água	5x		Acessibilidade via estradas
Proximidade de cursos d'água	2x		Declividade do terreno
Proximidade da mancha de rejeito	8x		Acessibilidade via estradas
Proximidade da mancha de rejeito	4x		Declividade do terreno
Declividade do terreno	2x		Acessibilidade via estradas

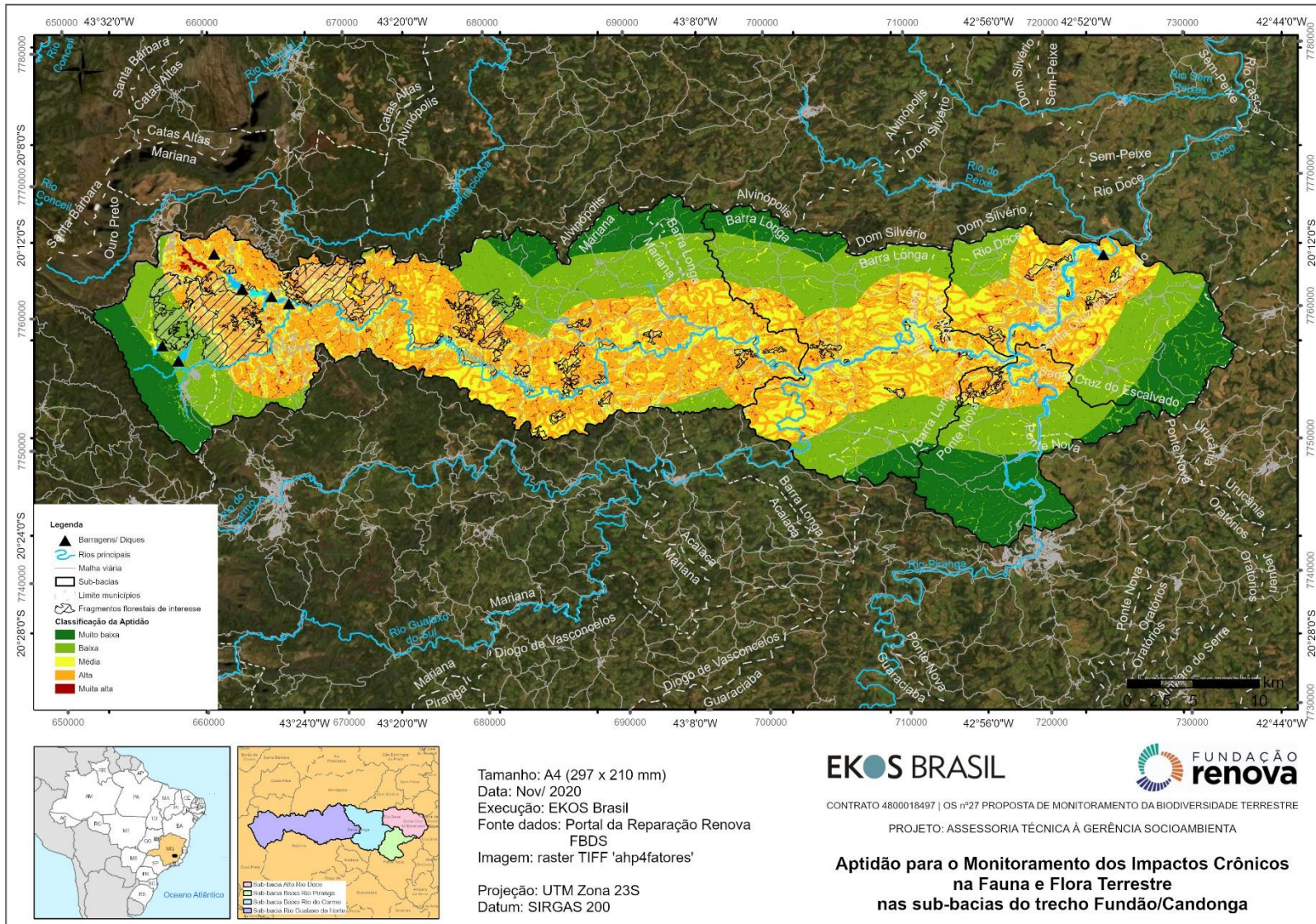
Uma vez que o coeficiente de consistência (do inglês CR) foi aceitável, pôde-se calcular a matriz de decisão (Tabela 7) que, por sua vez, embasou o ranqueamento dos critérios. Os resultados dos ranques e respectivas prioridades foram: Proximidade da mancha de rejeito (1º, 65,6%), Proximidade de cursos d'água (2º, 18%), Declividade do terreno (3º, 11,1%) e Acessibilidade via estradas (4º, 5,3%).

Tabela 7: Matriz de decisão da AHP

	Proximidade da mancha de rejeito	Proximidade de cursos d'água	Acessibilidade via estradas	Declividade do terreno
Proximidade da mancha de rejeito	1.0	0.1	5.0	2.0
Proximidade de cursos d'água	7.0	1.0	8.0	4.0
Acessibilidade via estradas	0.2	0.1	1.0	5.0
Declividade do terreno	0.5	0.3	2.0	1.0

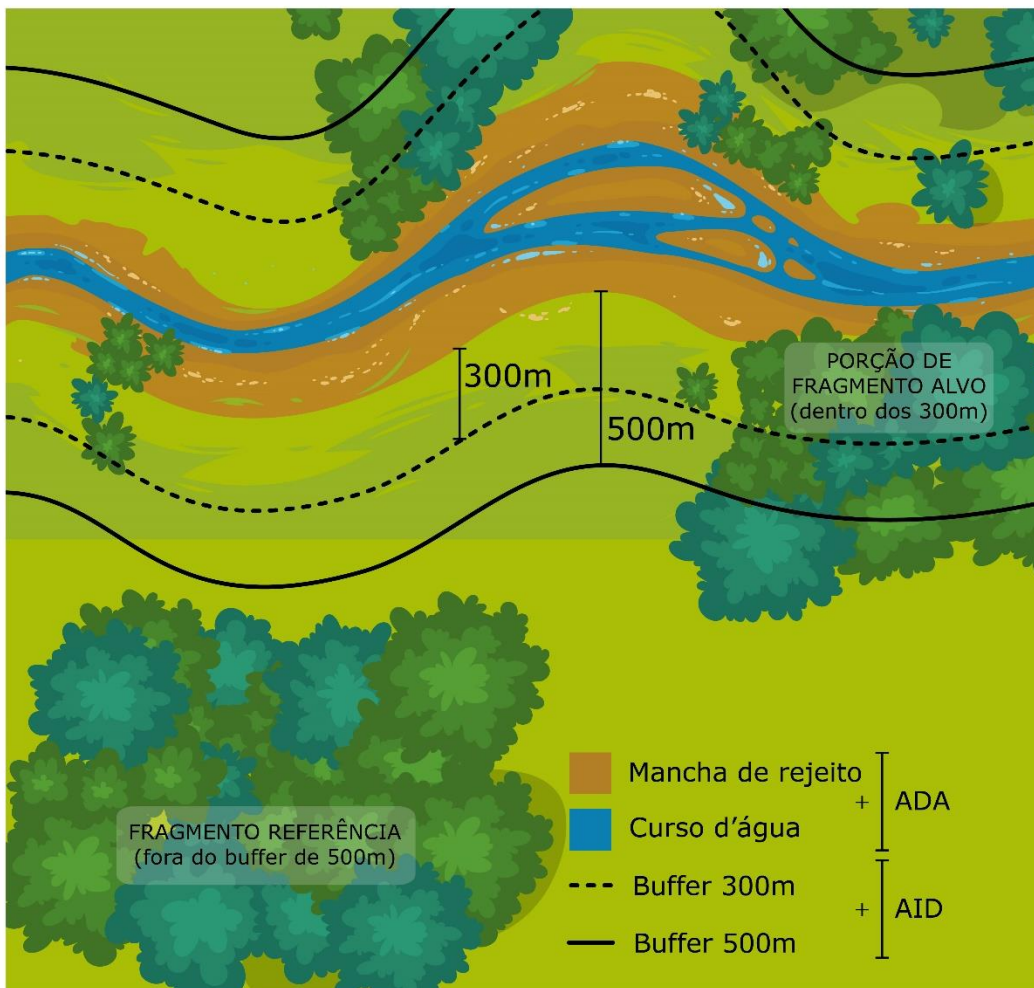
Com base nos cálculos da AHP, as camadas de dados geoespaciais associadas aos 4 critérios foram *rasterizadas*, parametrizadas, normalizadas (escala de 1 a 10) e finalmente sobrepostas e processadas no QGIS com base nos pesos finais resultantes do cálculo da AHP. Tal procedimento gerou um mapa (Figura 12, Anexo 4) que reflete os níveis de aptidão para o monitoramento da fauna e flora terrestre no trecho Fundação-UHE Risoleta Neves. A aptidão foi classificada em uma escala de 5 níveis, variando de muito baixa a muito elevada. Conforme se vê na Figura 12, os fragmentos a serem prioritariamente selecionados são aqueles que apresentam maiores valores de aptidão segundo a AHP, além de outros atributos a serem considerados e validados no contexto específico de cada grupo de fauna e flora. De maneira geral, quando mais apto e maior o fragmento, mais prioritários eles serão para o monitoramento ALVO e de REFERÊNCIA.

Figura 12: Mapa de Aptidão para o Monitoramento dos Impactos Crônicos na Fauna e Flora Terrestre nas sub-bacias do Trecho Fundão/Candonga



Conforme já mencionado, no caso específico do monitoramento ALVO, deve-se, necessariamente selecionar as porções de fragmento florestal localizados na área direta ou mais indiretamente impactada pelo rejeito dentro de um buffer mais restritivo de 300 m da ADA. No caso do monitoramento de REFERÊNCIA deve-se, necessariamente, selecionar os fragmentos localizados fora da AID (fragmentos localizados fora do *buffer* de 500 m em relação à ADA) (Figura 13).

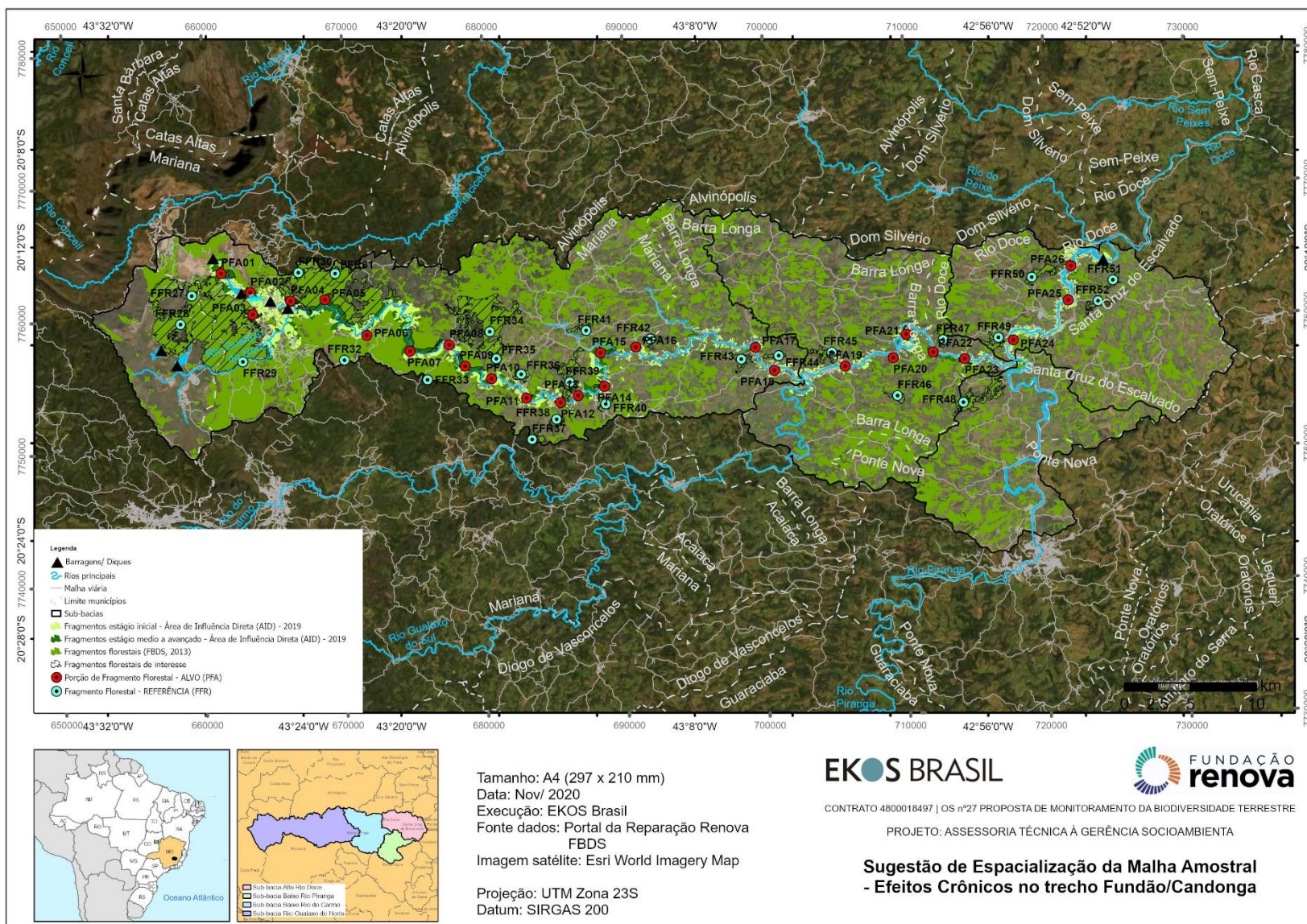
Figura 13: Esquema ilustrativo de indicação da ADA, AID, Porção de Fragmento Alvo e Fragmento Referência



Na Figura 14 (Anexo 5), são apresentadas as 26 porções de fragmento florestal ALVO (legendados no mapa como PFA) e os 52 fragmentos florestais de REFERÊNCIA (legendados como FFR) sugeridos pela Equipe Ekos. Tais fragmentos hachurados e numerados, foram selecionados com base nos resultados da AHP de aptidão, para acomodar parte da malha amostral descrita neste documento. Todavia, não se havendo condições

de monitoramento naqueles fragmentos (por razões de falta de autorização dos proprietários ou rompimento de premissas de validação), poderão ser adotados outros fragmentos, devendo-se, sempre que possível, observar os resultados da AHP. Para tal, sugere-se que sejam considerados os valores da AHP nas áreas correspondentes aos fragmentos florestais. Deve-se observar que, a depender do tamanho do fragmento, pode haver situações nas quais um único fragmento terá múltiplas categorias de aptidão, ou seja, ter porções de baixa e de alta aptidão. Nesses casos, deve-se priorizar o uso das porções do fragmento mais aptas para os programas de monitoramento.

Figura 14: Mapa com Sugestão de Espacialização da Malha Amostral – Efeitos Crônicos no Trecho Fundão/Candonga



4.1.2. Sítios amostrais para o monitoramento dos eventuais impactos crônicos em ilhas fluviais e áreas de restinga

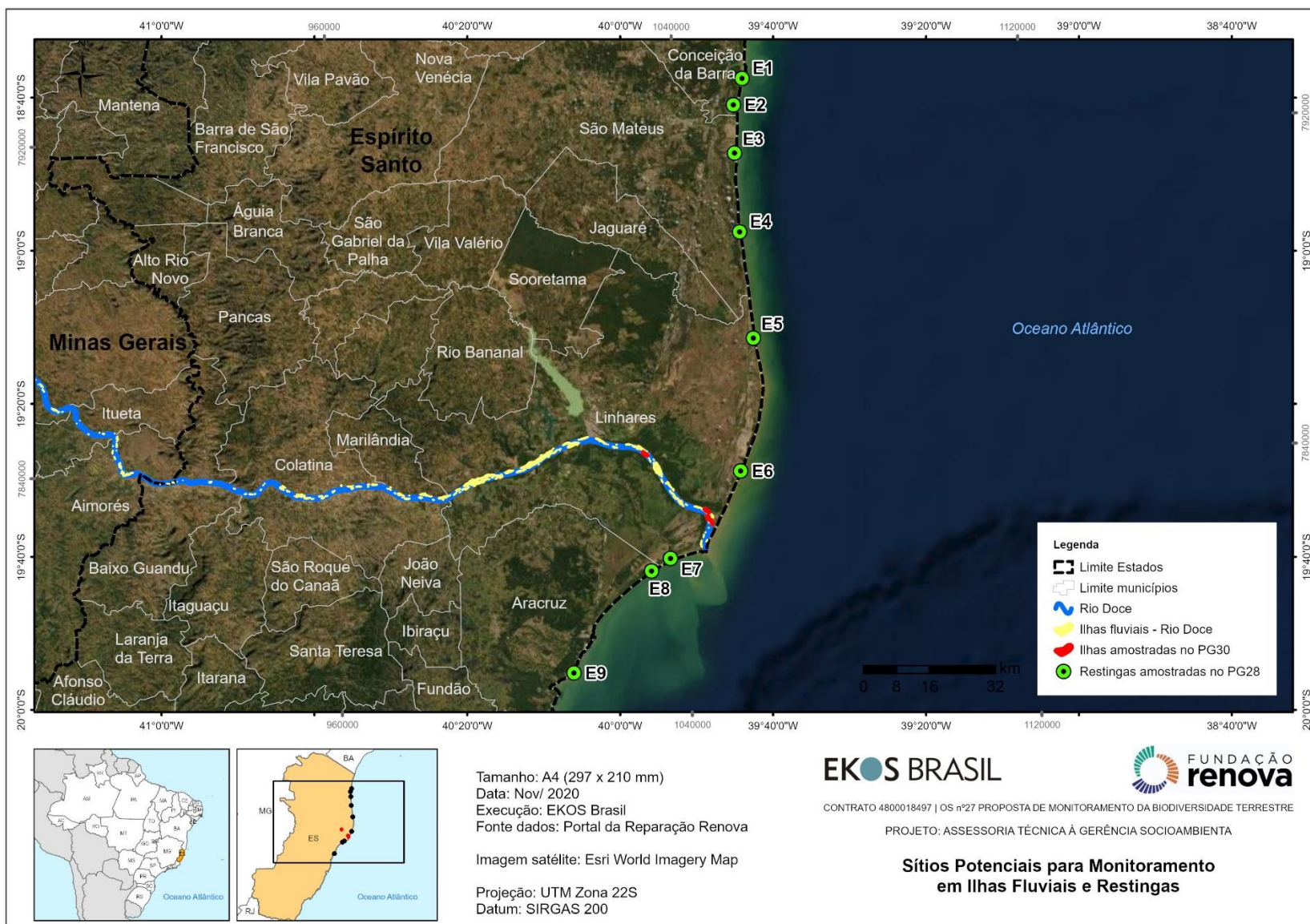
Conforme mencionado na seção 4.1.1, a deposição de rejeito extra-calha deu-se, em sua grande maioria, no trecho Fundão – UHE Risoleta Neves, conforme atestaram recentemente estudos da Lactec (2020). Todavia, outras porções terrestres de menor extensão, localizadas a jusante da UHE Risoleta Neves, também foram em alguma medida afetadas pelo rejeito. Há de se destacar também que ainda estão em fase de consolidação os estudos para definição do impacto extra-calha considerando os regimes hidrológicos projetados para o futuro. Assim, é possível que algumas áreas de ambiente terrestre, que incluem pequenas porções das margens afetadas pelas cheias naturais de 2016, ilhas fluviais, ambientes terrestres no delta do rio Doce e restingas próximas à foz do rio. Os impactos crônicos persistentes dos rejeitos em tais áreas, dada a magnitude desproporcionalmente baixa dos impactos, tendem a ser bem mais difíceis de se detectar. Todavia, os efeitos eventualmente detectados no trecho Fundão – UHE Risoleta Neves poderão ter implicações para essas áreas que foram, em alguma medida, afetadas. Nesse sentido, embora não se justifique um programa de monitoramento amplo como o proposto para o trecho a montante da UHE Risoleta Neves, faz-se importante continuar o diagnóstico da fauna e flora terrestre em tais áreas. Para tal, sugere-se que sejam amostradas áreas já previamente contempladas em programas de monitoramento.

Na região da foz, quatro ilhas fluviais foram alvo de coletas de fauna e flora terrestre durante as campanhas da Avaliação Ecológica Rápida. Indica-se a amostragem em cinco ilhas na foz, preferencialmente englobando as que já foram previamente amostradas. As ilhas devem comportar os transectos de amostragem de fauna e permitir o acesso. Assim, as ilhas devem ter área suficiente para comportar dois transectos paralelos de 300 metros de comprimento, distantes pelo menos 100 metros entre si.

A partir da foz do rio Doce, 9 áreas de restinga foram alvo de coletas do Programa 28 de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (Figura 15, Anexo 6). Propõe-se selecionar 6 dessas áreas de restinga, sendo três ao sul e outras três ao norte da foz, contemplando o monitoramento de contaminantes em pequenos vertebrados terrestres. As restingas selecionadas devem ter área suficiente para comportar dois transectos paralelos de 300 metros, distantes pelo menos 100 metros entre si.

Por fim, importante ressaltar que a proposta de malha amostral apresentada aqui pode ser ajustada ou modificada à luz de novas informações e dados sobre os impactos da deposição de rejeitos sobre o ambiente terrestre no trecho a montante da UHE Risoleta Neves. Uma das premissas da presente proposta é que o monitoramento seja adaptativo, o que significa que além de inclusão e exclusão de indicadores também possa ser feita a incorporação de novos sítios amostrais, desde que estejam associados às Perguntas aqui propostas e que os protocolos metodológicos sejam replicados.

Figura 15: Mapa com Sítios Potenciais para Monitoramento em Ilhas Fluviais e Restingas



4.2. MALHA AMOSTRAL PARA MONITORAMENTO DA RESTAURAÇÃO

Para a seleção das unidades amostrais deverão ser utilizadas as informações dos Programas de Restauração da Fundação Renova. Para definição final da malha amostral as seguintes etapas devem ser percorridas, sendo que a última é posterior à entrega desse produto:

(1) Elegibilidade das áreas: Para o monitoramento da restauração, são elegíveis todas as áreas sob processo de restauração em condução pela Fundação Renova. São consideradas áreas em restauração todas as áreas, independente da técnica de restauração adotada. As áreas elegíveis serão divididas em grupos de:

6. (a) áreas alvo, sendo estas definidas como aquelas áreas sob ação de restauração ativa pela Fundação Renova. Estas áreas deverão ser classificadas desde já como (1) áreas de restauração em contato com o rejeito; (2) áreas de restauração sem contato com o rejeito, mas dentro do *buffer* de 300m e (3) áreas de restauração fora da AID, ou seja, fora do *buffer* de 500m;
7. (b) áreas de referência intermediária, sendo estas definidas como aqueles fragmentos de florestas remanescentes classificadas como florestas em estágio inicial nesse trecho da bacia.
8. (c) áreas de referência final, sendo estas definidas como aquelas áreas de fragmentos próximos definidos no inventário florestal da bacia do Rio Doce como em estágio médio e avançado.

(2) Espacialização e representatividade: os sítios amostrais devem permitir uma cobertura amostral adequada; representar as condições da bacia (geologia, conservação, relevo, uso e ocupação do solo) e garantir a independência entre os pontos. De modo a garantir a melhor representatividade, serão selecionadas 10 áreas para monitoramento permanente. Além destas áreas, deverão ser sorteadas 10 áreas adicionais entre todas as áreas elegíveis (critério 1) a cada evento de monitoramento. As áreas sorteadas têm por objetivo garantir um completo entendimento das áreas em processo de restauração, e estas devem ser amostradas com a mesma metodologia das parcelas permanentes.

(3) Validação das parcelas permanentes: após a definição das 10 áreas amostrais permanentes pela equipe, é necessária uma última etapa em que a Fundação Renova deverá avaliar e validar os *plots* de parcelas permanentes. Como as parcelas serão amostradas e monitoradas sistematicamente durante 10 anos, é necessária uma análise por parte da Fundação Renova com vistas a garantir o bom andamento do monitoramento, visando atingir os descritores de sustentabilidade dessas ações de restauração ecológica.

Para a malha amostral da regeneração, serão avaliados um total de 100 sítios amostrais, entre áreas de restauração e áreas de referência. Para as áreas de restauração, deverão ser amostradas **60 unidades amostrais, sendo estas áreas com atividade de Restauração Ativa**, assim divididas:

- a) 20 Áreas em Restauração Ativa diretamente sobre a faixa de depósito do rejeito;
- b) 20 Áreas em Restauração Ativa, fora da faixa de depósito do rejeito, mas dentro da área diretamente afetada (*buffer* de 300m) e;
- c) 20 Áreas em Restauração Ativa, porém fora da área diretamente afetada e da área de influência direta (fora

do *buffer* de 500m), e, portanto, distante das áreas impactadas pelo rompimento da barragem.

Em relação à distribuição entre parcelas permanentes e parcelas móveis, dessas 20 áreas de restauração ativa em cada uma das 3 situações acima descritas (a, b e c), **10 áreas de restauração ativa** receberão parcelas permanentes, que deverão ser reamostradas ao longo do estudo. Outras **10 áreas de restauração** em cada uma das 3 situações acima descritas (a, b e c) deverão ser sorteadas dentre todas as áreas elegíveis (i.e., entre as áreas de restauração ativa implantadas em cada período temporal) para monitoramento a cada campanha, constituindo assim uma cronosequência

As ações de restauração da Fundação Renova na bacia do rio Doce têm prazo definido para 10 anos. Da mesma forma, o Plano de Ação do PG30 tem prazo de 10 anos, com projeção de finalização para o ano de 2029. Porém, a equipe Ekos entende ser fundamental monitorar os resultados das ações de restauração para além dos próximos 10 anos. Uma vez que as ações de restauração ocorrerão ao longo desses próximos 10 anos, sendo implantadas ações de restauração a cada ano e, portanto, muitas das áreas em restauração vão estar ainda muito novas ao final de 10 anos, e certamente não terão atingido descritores adequados de monitoramento, que permitirão afirmar que essas áreas estarão em trajetória de sucesso, com valores de estrutura, funcionamento e provimento de serviços ecossistêmicos comparável às florestas de referência, mesmo com florestas em estágio inicial, quanto mais com florestas em estágio médio e final. Assim, a equipe recomenda que sejam avaliadas as alternativas para a realização dessas últimas etapas do monitoramento da restauração.

Ainda, serão selecionados **20 fragmentos de florestas remanescentes classificados como florestas em estágio inicial** nesse trecho da bacia, onde em cada um deles será alocada uma unidade amostral, sendo esses considerados **áreas de referência intermediária**. A alocação espacial destas áreas deverá sempre ser o mais próximo possível dos PFA do item anterior, garantindo a espacialização inicial proposta. Por fim, como áreas de **referência final** deverão ser usadas as mesmas 20 áreas de referência do item 1.1.3.2 (Vegetação nativa não eliminada com o derramamento de rejeito).

4.3. Malha Amostral para Organismos com Características Biológicas Específicas

Para definição final da malha amostral do monitoramento de organismos com demandas de habitat específicos (Figura 1) as seguintes etapas devem ser percorridas, sendo que as duas últimas são posteriores à entrega desse produto:

- (1) Elegibilidade: as áreas para amostragem destes grupos deverão ser aquelas onde ocorrem as características ambientais explicitadas pelos protocolos metodológicos específicos (*Phrynosoma*, *Hydromedusa*).
- (2) Espacialização: a malha amostral de elegibilidade para estes organismos deverá ser cruzada com a malha amostral do monitoramento do impacto da deposição de rejeito, procurando compatibilizar ao máximo estas duas. Esta compatibilização é necessária e desejável tanto para melhorar a robustez das análises e conclusões, quanto para melhorar o aspecto logístico das coletas.
- (3) Validação dos sítios amostrais em solo: A indicação dos sítios foi feita com base nos mapas e arquivos de

sensoriamento remoto disponibilizados pela Fundação Renova. Todos os pontos indicados, todavia, devem passar por uma fase de validação em campo, onde deverão ser avaliados aspectos como acesso, autorização de coleta pelos proprietários, e confirmação da adequabilidade ambiental para o grupo amostrado.

(4) Validação das parcelas permanentes: após a validação em solo dos sítios amostrais, é necessária uma última etapa em que a Fundação Renova deverá avaliar e validar os *plots* de parcelas permanentes. Como as parcelas serão amostradas e monitoradas sistematicamente durante 10 anos, é necessária uma análise por parte da Fundação Renova com vistas a garantir o bom andamento do monitoramento.

Amostragem de *Phrynos geoffroanus*

Os pontos para amostragem e avaliação do impacto do rompimento da barragem de Fundão no cágado *Phrynos geoffroanus* serão trechos de rios que possuam características adequadas para a espécie (ver Tabela 11). Serão amostrados quatro trechos de rio Alvo (TRA - afetados pelo rejeito) e seis trechos de rio Referência (TRR - não afetados pelo rejeito) ao longo do alto rio Doce, além de outros pontos onde a espécie será amostrada para análises de contaminantes. Os trechos Alvo são aqueles onde houve impacto direto do rejeito nos rios Gualaxo do Norte e Carmo, até a sua confluência com o rio Piranga. Trechos de referência são porções de rios da bacia do alto rio Doce não afetados pela passagem do rejeito. Estes trechos devem estar localizados nas seguintes sub-bacias: Carmo (trecho a montante da sua confluência com o Gualaxo do Norte), Piranga, e Piracicaba. Os trechos de referência podem estar localizados em qualquer altura das sub-bacias supracitadas, entretanto, é importante que dentro do possível tenham vazão compatível à dos trechos afetados. Para excluir potenciais efeitos indiretos do rompimento, os trechos de referência devem estar distantes cerca de 10 km de trechos diretamente afetados.

Amostragem de *Hydromedusa maximiliani*

A espécie *Hydromedusa maximiliani* é exigente quanto às condições ambientais onde é encontrada, portanto espera-se encontrá-la apenas em áreas conservadas, sendo assim boa indicadora do processo de restauração. Para esta espécie, não é possível determinar os pontos *a priori*, sendo necessária uma etapa de mapeamento das populações nos tributários que drenam para a área diretamente afetada pelo rejeito (ver Tabela 12).

5. PERGUNTAS ESPECÍFICAS DO MONITORAMENTO, COM CONTEXTUALIZAÇÃO, HIPÓTESES, INDICADORES PREDIÇÕES E METODOLOGIA

Condizente com a proposta de monitoramento focada em três Temas Gerais, são apresentados aqui os desdobramentos deles em questionamentos mais específicos e detalhamentos dentro de cada tópico com as bases conceituais que sustentam as perguntas e os indicadores utilizados para cada uma delas, com a devida justificativa técnico-científica para essa seleção.

Uma vez que diversos estudos envolvendo outros grupos temáticos serão desenvolvidos nestes mesmos sítios amostrais, um planejamento cuidadoso deve ser realizado de modo a minimizar os impactos do estudo no ambiente e no bom andamento dos trabalhos de campo. Para isso, a rede de acessos aos pontos e parcelas de amostragem deverá ser planejada de modo a reduzir ao máximo a necessidade de abertura de novas trilhas e o pisoteio do sub-bosque, minimizando assim os impactos sobre o ambiente. Os trabalhos de campo dos diferentes profissionais envolvidos neste programa deverão ser coordenados de modo a evitar que pesquisadores responsáveis por diferentes grupos temáticos trabalhem simultaneamente em um mesmo sítio de amostragem, de modo que um grupo não interfira nos trabalhos de campo do outro grupo.

5.1. TEMA 1: QUAIS OS IMPACTOS CRÔNICOS (PERSISTENTES OU RECORRENTES) DO EVENTO SOBRE AS ESPÉCIES DA FAUNA E FLORA TERRESTRES DA BACIA DO RIO DOCE, E QUAL A MAGNITUDE E ABRANGÊNCIA ESPACIAL E TEMPORAL DESTES IMPACTOS?

5.1.1. Bases conceituais

Os impactos da contaminação por elementos metálicos na área compreendida entre a barragem de Fundão e a UHE Risoleta Neves foram significativamente agravados pelo rompimento da barragem de contenção de rejeito de Fundão (Guerra et al. 2017; Vergilio et al. 2020). Apesar do rejeito ter sido classificado quimicamente como inerte e não perigoso, a inundação pela lama provocou a elevação das concentrações de ferro (Fe) e manganês (Mn), além de causar a suspensão e solubilização de resíduos de mineração historicamente depositados nas calhas dos cursos hídricos afetados (Segura et al. 2016). Vários estudos demonstram que ocorreu incremento da concentração de elementos metálicos como Fe, Mn e arsênio (As) em amostras de solo, vegetação e água de locais afetados, em comparação às áreas de referência (Reis et al. 2017; Silva et al. 2018; Coelho et al. 2020). Alguns elementos, apesar de desempenharem papéis importantes nos processos fisiológicos dos organismos, podem causar, por meio da exposição excessiva, desenvolvimento de doenças degenerativas em humanos, além de distúrbios metabólicos, nutricionais e oxidativos em plantas (Fernando & Lynch 2015; Nikolic & Pavlovic 2018).

Alguns estudos, entretanto, indicam a possibilidade de utilização dessas áreas para atividades agropecuárias, uma vez que estariam isentas de potencial tóxico, conforme relatório Golder (2016) e do programa Uso Sustentável da Terra (2019). O relatório recentemente divulgado de Consolidação dos Estudos de Avaliação de Risco à Saúde Humana indicou que o solo atingido pelos rejeitos de minério não apresenta metais que possam causar risco toxicológico à saúde humana, apontando o restabelecimento das atividades agropecuárias em Mariana e Barra Longa. Segundo a Gerência do programa de saúde da Fundação Renova, os estudos apontam que os riscos existentes são pontuais em virtude da disposição e da quantidade de metais encontrados na calha dos rios, água superficial, água para consumo humano, solo, poeira domiciliar e em alimentos de origem vegetal e animal.

O monitoramento e a mitigação do impacto dos contaminantes podem ser realizados por meio de estudos de bioacumulação e estimativa de transferência de metais pesados nas cadeias tróficas, avaliando-se a percentagem de espécies contaminadas identificadas e o grau de contaminação, comparando-se áreas contaminadas e áreas de referência. Várias questões inicialmente formuladas pela Câmara Técnica de

Biodiversidade incluíam a necessidade de informações sobre acúmulo de metais nas diferentes espécies da biota e no solo; até qual distância do rio Doce estaria ocorrendo a acumulação de metais e como os metais estariam circulando nas cadeias tróficas. Parte dessas questões constavam no Termo de Referência para a Avaliação Ecológica Rápida, e foram investigadas para diversos grupos de fauna, contudo, não foram realizados para a vegetação. Como essas questões devem estar relacionadas com os outros programas de monitoramento em execução pela Fundação Renova, a nova abordagem sugerida para esses questionamentos dentro do Programa de Biodiversidade foi reformulada e associada à avaliação e monitoramento dos impactos persistentes, além de verificar se estão sendo respondidas pelas atividades de outros programas.

Uma proposição bem embasada de monitoramento precisaria de uma robusta revisão do “antes” rompimento para tentar estabelecer nexos causais. Entretanto, em termos de análise de contaminantes na flora, a base de dados é praticamente inexistente, o que torna indispensável considerar áreas controle, não atingidas pela lama. Importante considerar estudos de Avaliação de Risco Ecológico (em andamento) no alinhamento dos procedimentos a fim de evitar sobreposição ou dissonância dos dados gerados. Por exemplo: informações sobre análises de exposição, de efeito, quais as linhas de evidência, os pontos e períodos de amostragem, a seleção de indivíduos, compartimentos biológicos analisados e quais contaminantes analisados.

As respostas biológicas podem ser percebidas com o monitoramento de grupos de organismos conhecidos como bioindicadores de qualidade do habitat, utilizados para monitorar a saúde do ambiente onde vivem (Parmar et al. 2016). Espécies bioindicadoras fornecem informações sobre os ambientes que ocupam e apresentam sensibilidade a alterações dos atributos do habitat. Tais atributos envolvem desde características climáticas, físico-químicas e estruturais do habitat, mas também mudanças causadas por atividades antrópicas como a poluição, mudança na quantidade e qualidade do habitat e mudanças no uso da terra como a agricultura, urbanização ou a mineração. Um grupo é considerado bom indicador biológico quando: apresenta sua taxonomia bem definida; sua identificação taxonômica é relativamente fácil, apresenta distribuição geográfica ampla, ciclo de vida curto em relação a duração do estressor e padrões de distribuição e de interações biológicas bem conhecidas e em diferentes condições ambientais.

A proposição, considerando as premissas e critérios estabelecidos no Workshop para Definição de Indicadores de Resultados da Biodiversidade, pretende utilizar poucos, mas eficazes indicadores, buscando associar a análise de contaminantes com funções e serviços ecossistêmicos, a saber: fonte de alimentação (herbívoria, alimentação de morcegos e predação mensurado a partir do uso de lagartas artificiais); fonte de regenerantes (frutos e sementes); fonte para insetos polinizadores (flores e manutenção de insetos para polinização de áreas agrícolas); e suporte físico (contenção de erosão e retenção de contaminantes no solo) (Navarro-Cano et al. 2018). Após uma análise inicial, o monitoramento e avaliação de contaminantes pode ser feito por meio de desenvolvimento de pesquisas com plantas bioindicadoras e pequenos vertebrados que tenham se mostrado mais promissores no acúmulo de metais pesados, assim como monitorar os teores de metais pesados e particulados nesses organismos nas áreas naturais e em recuperação. A determinação do fator de bioconcentração (FBC) e de translocação (FT) nessas áreas é importante para se definir o potencial da espécie para a fitorremediação (fitoestabilização dos contaminantes) e para o risco potencial de biomagnificação, respectivamente (Liu et al. 2016; Midhat et al. 2017; Kaur et al. 2019).

Embora expressiva parte do PG30 esteja voltado para o monitoramento da fauna, uma vez que a parte vegetal tem ficado a cargo da Câmara Técnica de Restauração Florestal e Produção de Água (CT-Flor), é importante que essa análise, flora e fauna, seja feita de forma conjunta e integrada, pela indissociabilidade e

interdependência dos sistemas, considerando que qualquer alteração na flora, inevitavelmente incorrerá em modificações nas comunidades de fauna.

Dentro deste contexto, é possível identificar duas grandes classes de perguntas, a primeira que tenta entender o efeito de possíveis contaminantes persistentes e detectáveis nos indivíduos e que podem ter efeitos na biota terrestre do trecho estudado. A segunda classe de perguntas são as que tentam entender os efeitos derivados do impacto original, isto é, da passagem e deposição de rejeitos oriundos do rompimento da barragem de Fundão. Neste segundo caso, mesmo que não haja o efeito de contaminantes em si, é plausível pensar que a perda de habitats e a fragmentação dos ecossistemas tenham levado a pressões nas comunidades terrestres, levando à simplificação ou perda de diversidade da biota terrestre.

5.1.2. Perguntas e indicadores relacionados aos contaminantes presentes no rejeito que podem persistir na biota terrestre.

Pergunta 1 - Qual a magnitude, abrangência espacial e temporal dos impactos decorrentes da presença de contaminantes sobre a flora terrestre da bacia do rio Doce?

Contextualização

Os impactos na vegetação terrestre decorrentes da presença de contaminantes restringem-se, basicamente, às áreas em que ocorreu deposição de rejeitos, nas margens dos cursos d'água e nas áreas adjacentes passíveis de inundação. Por ocasião do rompimento houve severo dano resultante da remoção e/ou soterramento da vegetação existente, seguido de mudanças das condições físicas, químicas e biológicas nas áreas afetadas, as quais ainda persistem. Outros impactos recorrentes resultam dos processos de inundação que ocorrem durante o período chuvoso, provocando a ressuspensão dos sedimentos presentes no leito dos córregos e rios e a deposição nas margens e áreas alagadas. Os contaminantes presentes no rejeito ou mobilizados pela onda de rejeitos e disponibilizados no ambiente promovem mudanças na qualidade do solo e, em consequência, aumento das concentrações de metais na vegetação, afetando diretamente as espécies alvo e, indiretamente, a biota da cadeia trófica, com biomagnificação dos metais e redução de populações de polinizadores (Vieira et al. 2020). Fato é que, além dos danos diretos dos metais pesados à vegetação, impactos indiretos podem ocorrer por meio da reduzida disponibilidade de nutrientes, baixo conteúdo de matéria orgânica, elevada densidade do tecnossolo e baixa capacidade de troca catiônica (da Silva Cruz et al. 2020) que podem comprometer o estabelecimento das plantas.

Hipóteses & Predições

- A hipótese geral é que a presença do rejeito depositado nas margens dos cursos d'água provoca contaminação por metais pesados em plantas de fragmentos florestais no trecho entre a barragem de Fundão e a UHE Risoleta Neves.
- Espera-se que a concentração de contaminantes seja maior em plantas nas áreas diretamente afetadas do que em áreas de referência não impactadas.
- Espera-se diminuição dos impactos à medida que se distancia das áreas de maior acúmulo de rejeitos, tendendo à normalidade nas áreas indiretamente afetadas.

- Espera-se que, com o tempo, diminuição das concentrações de contaminantes disponíveis para absorção pelas plantas diminua e, em consequência, redução do acúmulo na vegetação.

Indicador(es) proposto(s)

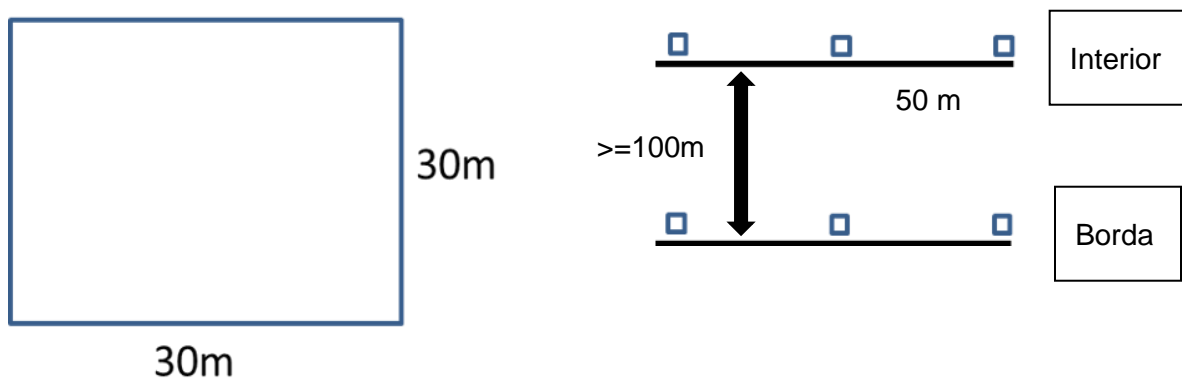
- Concentração de contaminantes em tecidos de espécies de plantas terrestres.

Protocolos metodológicos

Amostragem

Para avaliar a concentração de elementos contaminantes em plantas terrestres, serão avaliados 40 fragmentos de vegetação natural (estágio médio ou avançado), sendo 20 fragmentos em contato com o rio ou a faixa de depósito do rejeito (fragmentos Alvo) e 20 fragmentos sem contato com o rio e fora da faixa de deposição de rejeito (fragmentos Referência). Em cada fragmento serão alocadas 6 parcelas de 30x30m (900m²), distribuídas em dois transectos, um na borda (onde ocorreu deposição de rejeito) e um no interior (fora da deposição de rejeito), serão as mesmas parcelas para o protocolo de vegetação da Pergunta 4. O transecto da borda vai descontar os primeiros 10 metros de borda para alocação do transecto e estará distante no mínimo 100 metros do transecto do interior. Em cada transecto serão alocadas 3 parcelas permanentes, de 30x30m cada, distantes no transecto pelo menos 50m uma das outras (Figura 16).

Figura 16: Desenho amostral dos transectos com 3 parcelas permanentes cada de 30x30m, distantes 50m no transecto. O transecto na borda representa o limite entre a deposição de rejeito e a vegetação remanescente sem deposição de rejeito. O interior é a porção do fragmento sem deposição de rejeito.



Na primeira campanha de monitoramento sugere-se que as amostragens devem ser feitas na estação chuvosa e na estação seca, seguindo o delineamento amostral de unidades em áreas diretamente afetadas pela deposição de rejeitos (ADA) e áreas fora da faixa de deposição de rejeito. O monitoramento dos contaminantes deve ter periodicidade semestral durante 5 anos. Dependendo dos resultados obtidos nas amostragens semestrais, após dois anos de monitoramento a coleta de dados poderá ser redimensionada para amostragens anuais ou mesmo encerrada caso fique demonstrada a ausência do efeito.

Em cada fragmento deverão ser selecionados indivíduos pertencentes a espécies que possam fornecer pelo menos 10 espécimes por transecto (borda e interior), considerando plantas com diâmetro a altura do peito (DAP) maior do que 5 cm, evitando árvores muito jovens. Atentar para selecionar indivíduos com características

fenológicas próximas, especialmente em termos de DAP. Os indivíduos devem ser marcados, medidos, mapeados (“x” e “y”) e identificados, preferencialmente utilizados na análise de estrutura de comunidades (Pergunta 4), para acompanhamento em campanhas posteriores. Dependendo da dificuldade em obter espécies vegetais nativas que possam preencher os requisitos, pode-se optar por utilizar espécies vegetais não nativas. Não há restrição na variação das espécies em áreas distintas, desde que tenha correspondência com a área de referência.

As amostragens deverão contemplar os compartimentos biológicos raízes, folhas e, havendo disponibilidade, frutos, coletados em quatro pontos ao redor das plantas, dando origem a uma amostra composta por planta. As raízes devem ser coletadas na profundidade 0 – 20 cm, seguindo o mesmo padrão de amostragem para análise de solo, lavadas para remoção de solo aderido, armazenadas em sacos plásticos e encaminhadas ao laboratório credenciado e com padronização de métodos de quantificação de elementos químicos em amostras biológicas. As amostras de folhas deverão ser provenientes de ramos maduros, da porção mediana das plantas e expostas à luz solar, dos quais serão selecionadas folhas jovens completamente expandidas a partir do ápice, totalizando, aproximadamente, 100 g de folhas (massa fresca). As amostras das plantas destinadas à análise de contaminantes deverão ser acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao laboratório, conforme procedimento adotado para as amostras de raízes.

Amostras de folhas e raízes destinadas a análise de danos biológicos, por meio de quantificação da peroxidação lipídica, deverão ser armazenadas a -20°C e transportadas para o laboratório para proceder à análise bioquímica/estrutural. Por até um mês as amostras poderão ser mantidas nessa temperatura e, para períodos mais prolongados, recomenda-se armazenar a -80 °C (Grotto et al. 2009).

Determinação do acúmulo dos elementos químicos nas plantas

O material vegetal (folhas, raízes e frutos) destinado à análise de metais e arsênio deverá ser lavado com solução ácida de HCl 0,01% e enxaguada com água destilada. As amostras de raízes, adicionalmente, deverão ser tratadas com ditionito-citrato-carbonato (DBC), para remover óxidos de ferro adsorvidos (Taylor e Crowder 1983). Resumidamente, esse método consiste na incubação de, aproximadamente, 1 g de raízes, numa solução com 40 mL de citrato de sódio 0,3 M ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5 mL bicarbonato de sódio 1 M (NaHCO_3) e 3 g de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), sob agitação, durante 3 h. Em seguida, as raízes serão lavadas e utilizadas para o processamento, assim como as amostras de folhas. Todo o material vegetal (raízes, folhas e frutos) deverá secar em estufa a 80 °C, até massa seca constante, e seguir para a análise dos contaminantes.

A análise dos elementos químicos e arsênio consiste, basicamente, de digestão ácida das amostras (normalmente mistura de ácido nítrico e perclórico), seguido de quantificação por meio de espectrofotometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado ou espectrofotometria de absorção atômica. A análise do arsênio, especificamente, requer o acoplamento de um sistema gerador de hidretos. Esses resultados deverão ser expressos em mg/kg de massa seca de plantas.

Da mesma maneira que é definido na análise de solos, a precisão da técnica de análise química do material vegetal deverá ser avaliada usando materiais de referência certificados, como *Lemna minor* (BCR-670) e *Spinacia oleracea* (SRM 1570a), ou outro material equivalente. Deverão ser fornecidos os padrões de controle de qualidade, a validação dos valores dos materiais certificados e os limites de detecção dos elementos.

Obtidos os valores de concentrações dos metais na planta e no solo sugere-se o estabelecimento de novos parâmetros para fins de vinculação aos serviços ecossistêmicos. Assim, os Fatores de Contaminação (CF), de Bioconcentração (BCF), de Translocação (TF) e Índice de Acumulação de Metal (MAI) poderiam fazer parte do processo analítico envolvendo os contaminantes no solo e na planta.

Resumidamente, o CF avalia a contaminação das áreas afetadas, considerando-se a concentração média do elemento na área afetada e a concentração do elemento na área de referência (Hakanson 1980). O BCF estabelece a relação de concentração do elemento na planta e no solo (Zayed et al. 1998). O TF define a relação entre o acúmulo do elemento nas folhas e nas raízes (Bose e Bhattacharyya 2008). O MAI será calculado de acordo com Liu et al. (2007).

Concentração de contaminantes no solo

Embora o termo metal pesado seja desaconselhado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ele ainda é utilizado para se referir a qualquer elemento químico metálico que possua uma densidade relativamente alta e é tóxico ou venenoso em baixas concentrações. Exemplos de metais pesados incluem mercúrio (Hg), cádmio (Cd), arsênio (As), cromo (Cr), tálio (Tl) e chumbo (Pb). Outros elementos como o manganês (Mn), níquel (Ni), zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co) e ferro (Fe), algumas vezes são definidos desta maneira. Na análise de solos e sedimentos, normalmente são determinados os seguintes elementos: Si, Al, Fe, Ti, P, Ca, Mg, K, Na, Ba, Mn, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, V, Pb e Zn.

Alguns desses metais são considerados nutrientes no solo quando em quantidades adequadas e outros são importantes cofatores enzimáticos, desempenhando papel fundamental em reações do metabolismo de organismos vivos. Entretanto, ações como mineração, depósito inadequado de rejeitos, operações industriais ou fenômenos naturais como erupções vulcânicas, expõem os organismos a concentrações acima do tolerável, aumentando a incidência de doenças nos seres vivos dos locais afetados (Tchounwou et al. 2012). Esses metais podem ser encontrados em diversas formas na natureza (diferentes tipos de óxidos mistos e outros minerais) e a sua biodisponibilidade é influenciada por fatores físicos como temperatura, forma encontrada (se adsorvidos ou como constituintes do mineral), solubilidade, por fatores químicos como suscetibilidade à complexação com substâncias que tornem os íons mais solúveis (constantes de complexação metálica) e por fatores biológicos como interações tróficas (que são as interações existentes entre diferentes grupos hierárquicos dentro de um ecossistema, tais como predação, competição, simbiose, mutualismo, etc), além de características individuais das espécies, como a produção de determinados agentes de complexação que aumentam a solubilidade dos metais pesados em determinado ambiente (Tchounwou et al. 2012). É importante, portanto, que os metais presentes em determinado ambiente sejam determinados, mas não somente em seu conteúdo total. Estratificar estes metais em conteúdo total e biodisponível é indispensável para a determinação do risco de toxicidade que eles apresentam a determinada biota.

De acordo com o relatório da Golder Associates (2017) os solos da região a ser monitorada (afetada pelo rompimento da barragem de Fundão) contém, naturalmente, elevadas concentrações de vários metais referentes aos valores de prevenção (VP) e valores de investigação para agricultura (VI) estabelecidos na Resolução CONAMA no 420/2009 (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2009). Especificamente em relação ao rejeito, as substâncias químicas de interesse (SQIs) incluem o Al, Mn e Fe. Entretanto, outros

elementos encontram-se presentes nas áreas afetadas, mesmo sem estar diretamente relacionados ao rejeito, como As, Cr, Co, Cu, V e Zn. Conforme demonstrado por diversos trabalhos realizados nas áreas impactadas com rejeitos de mineração, as melhorias das condições físico-químicas do solo, como incorporação de matéria orgânica, que promove a ligação dos metais pesados reduzindo a sua absorção pelas plantas e a migração no ambiente (Zago et al. 2019; Gagnon et al. 2020), a correção de pH, o aporte de nutrientes e a redução da densificação, tem potencial mitigador dos danos e favorecem o desenvolvimento da vegetação (Scotti et al. 2020).

A coleta de amostras é, provavelmente, o passo mais importante para a avaliação de uma área de estudo e, portanto, é essencial que a amostragem seja realizada com precaução e técnica, por profissionais especialistas, para evitar todas as fontes possíveis de erros, como contaminação e perdas de materiais, além de representar o local amostrado. Os responsáveis pelo planejamento, assim como os técnicos responsáveis pela coleta, devem estar familiarizados com os objetivos, metodologias e limitações do processo de amostragem, uma vez que todas as observações e dados gerados em campo ajudam na interpretação dos resultados analíticos, e podem esclarecer resultados não-conformes que podem ocorrer eventualmente. Após a escolha do local, é importante consultar estudos já realizados que contribuam com informações sobre as características da área de estudo e as principais atividades poluidoras do local, que podem influir na contaminação das águas, tais como: indústria, agricultura, mineração, zonas urbanas, etc.

Os materiais coletados devem ser acondicionados em frascos para amostragem limpos e esterilizados. Os frascos devem ser resistentes, quimicamente inertes, com perfeita vedação e de boca larga. De preferência, devem ser de vidro borossilicato âmbar ou de polietileno. Os vidros devem ser lavados com detergente específico, tipo Extran, permanecer por 24h em solução de ácido nítrico 10% e, posteriormente, devem ser enxaguados com água desionizada. As amostras devem ser identificadas e bem acondicionadas até a chegada ao laboratório. Todas as amostras coletadas devem ser etiquetadas com número, pela ordem da coleta. Na etiqueta da embalagem devem ser anotados a data, hora, temperatura local e número de identificação da posição geográfica (local) onde a amostra foi coletada. A documentação da amostragem de campo deve ser feita em um diário (caderno ou tablet). Os documentos relacionados com a coleta devem ser preenchidos e permanecer com as amostras até o destino. Todos os documentos de coleta, transporte, etc., devem ser retidos pelo coordenador do projeto e armazenados em local seguro. As amostras coletadas ficam sob a custódia do amostrador ou do custodiante até que elas sejam transportadas e entregues a um responsável.

A coleta do solo e do sedimento devem ser realizadas nos mesmos locais onde serão coletadas amostras da fauna e da flora, para correlação entre possíveis contaminantes encontrados tanto no material inorgânico como nas amostras biológicas. Uma coleta anual durante 10 anos é suficiente. Para as análises de metais pesados nos solos, 100 g por parcela são suficientes. Para avaliar se os níveis de contaminação nas amostras vegetais estão relacionados com as concentrações dos elementos no ambiente, amostras de solo serão coletadas e analisadas seguindo o protocolo abaixo.

O solo deverá estar limpo de vegetação, tendo o cuidado de não retirar uma camada muito espessa do solo durante a limpeza inicial. A primeira parte de amostragem (5 cm) deverá ser retirada com auxílio de uma espátula de aço inoxidável. Os próximos 20 cm deverão ser coletados com auxílio de um trado de aço inoxidável, desprezando-se o material aderido à superfície do trado para evitar contaminações. A depender das concentrações de metais pesados biodisponíveis nestas amostras, novas coletas deverão ser realizadas a até 80 cm de profundidade devido à sua mobilidade.

Deverão ser feitas coletas de solo em cinco pontos em cada parcela de 30x30 m, sendo um central e os demais em cada ponto cardinal (N, S, W, E), evitando-se as bordas e áreas com pisoteio. A gradagem única na profundidade de 0-20 cm deverá ser realizada na projeção da copa das árvores. O material utilizado para coleta deverá ser em aço inox e as amostras acondicionadas em vidros ou sacos plásticos devidamente identificados, secas ao ar e, posteriormente, em estufa. Em cada parcela, serão produzidas, além das amostras simples, uma amostra composta, por parcela, resultante da homogeneização das amostras simples. Para realização de análises físicas (densidade aparente, densidade de partícula e capacidade de retenção de água), serão coletadas 5 amostras em pontos distintos da parcela, conforme descrição anterior, próximos àqueles anteriormente selecionados, com cilindro metálico de 100 cm³ e encaminhado para análise. As amostras de solo deverão ser homogeneizadas em bandejas previamente limpas com HNO₃ em água (10% v/v) e enxaguadas com água deionizada. As luvas utilizadas para cada homogeneização deverão ser descartadas imediatamente após o processo (Filizola et al. 2006).

Para a separação das frações, o solo deve ser seco em estufa a 40 °C. As amostras devem ser peneiradas em peneiras com malha de 20 mm e de 2 mm. O material retido na peneira de 20 mm (calhaus) e na de 2 mm (cascalho) deve ser colocado em cápsula de porcelana com água, mais 10 mL de NaOH 1 N, agitando com auxílio de um bastão várias vezes durante o dia e mantido por uma noite nesta solução. Lavar bem estes materiais sobre peneira com malha de 2 mm. Deixar secar em estufa, esfriar e pesar cada fração. Colocar o material em sacos plásticos com etiquetas identificadoras das amostras e enviar para as análises físico-químicas: umidade, densidade aparente, densidade de partículas, porosidade total, microporosidade, macroporosidade, área superficial específica, análise granulométrica (Dispersão Total), argila dispersa em água e relação silte/argila, pH, carbono orgânico, nitrogênio total e acidez do solo.

As análises dos contaminantes e as análises físicas devem ser, preferencialmente, realizadas por Laboratórios credenciados, que possuam padronização de métodos de análise. As amostras de solo devem ser secas à sombra e posterior peneiramento em malha de inox com abertura de 2 mm, para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). As amostras, uma vez secas ao ar, homogeneizadas e peneiradas devem ser mantidas em recipientes de vidro ou polietileno fechados, à temperatura ambiente. As análises químicas de rotina do solo deverão seguir os protocolos US EPA 3051A, extração por Mehlich-1 e BCR.

As técnicas mais adequadas para determinação de elementos químicos são: Absorção atômica, ICP – AES (espectrofotometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado) ou ICP-MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado), fluorescência de raios X (alta resolução). A escolha dos equipamentos depende da disponibilidade, custo e grau de precisão desejada. Por exemplo, dependendo da idade, da manutenção e da qualidade do equipamento, ICP oferece uma sensibilidade em ppt (partes por trilhão), absorção atômica em ppb e fluorescência de raios X em ppm.

A quantificação dos teores pseudototais e disponíveis dos elementos no solo devem priorizar o arsênio (As), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), além de cobre (Cu), cobalto (Co), vanádio (V), níquel (Ni), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e cromo (Cr), conforme sugestão de trabalho prévio realizado pela ELLO Consultoria (2020) (relatório sob análise). Além dessa Consultoria, outros trabalhos referenciam a presença desses elementos, como a Bicho Mato (2019) e a Golder Associates (2016). Alternativamente, utilizar elementos presentes em bancos de dados disponíveis para a planície fluvial e considerar apenas aqueles que estejam acima do limite de background para a área impactada.

A metodologia para extração pseudototal dos elementos metálicos devem seguir o protocolo EPA 3051A (US EPA, 2007), que utiliza subamostras de 150 mg em vasos de Teflon, com capacidade de 75 mL, com 9 mL de HNO₃ e 3 mL de HCl concentrados, de pureza analítica, submetidas à irradiação em forno de micro-ondas. A fração disponível de metais (micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Ni e Zn) e elementos-traço (Cr, V, As, Cd e Pb)) deve ser extraída usando-se o extrator Mehlich-1 (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹) (Defilipo e Ribeiro 1997).

Alternativamente, para aquelas amostras que apresentarem concentrações elevadas de metais tóxicos, pode-se, alternativamente, utilizar o extrator Merealizar o protocolo de extração sequencial proposto pelo European Community Bureau of Reference (BCR) (Ure et al., 1993). O procedimento modificado relatado por Rauret et al. (1999) e Rauret et al. (2000) poderá ser realizado, incluindo quatro frações: (I) trocável, (II) redutível (III), oxidável e (IV) residual. É importante enfatizar que a segunda etapa do procedimento de BCR modificado é capaz de atingir componentes resistentes da fase de hidróxido de ferro devido ao baixo pH e não apenas devido ao agente redutor (Mossop e Davidson, 2003; Rauret et al., 1999; Sulkowski e Hirner, 2006).

Os métodos de extração EPA 3051A, extração Mehlich-1 e a extração sequencial BCR deverão ser realizados em triplicata e a quantificação dos metais nos extratos das diferentes frações deverá utilizar a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) ou espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ou espectrofotometria de absorção atômica e, no caso de arsênio, acoplado a um gerador de vapor de hidreto. Os materiais de referência padrão Solo Montana II (SRM 2711a) e BCR-701, ou equivalentes, deverão ser usados para validar os métodos utilizados, 3051A e BCR, respectivamente.

Após a determinação dos elementos químicos, aqueles considerados contaminantes devem ser analisados quanto à sua especiação química e biodisponibilidade. Especiação química é definida como um processo de identificação e quantificação das diferentes formas ou fases (grau de oxidação e/ou tipo de ligação química) em que um elemento pode estar presente em um material. Biodisponibilidade indica a proporção do elemento que pode ser absorvido ou utilizado por um organismo vivo.

A especiação química da parte sólida (solos e sedimentos) pode ser realizada por um conjunto de técnicas como extração sequencial, difração de raios X, microanálises, espectroscopia na região do infravermelho, difração de elétrons, entre outros, dependendo do tipo de contaminante a ser determinado e da necessidade de informação. A especiação dos elementos contaminantes encontrados na água pode ser determinada por microanálise e difração de elétrons.

Pergunta 2 - Quais concentrações de contaminantes na vegetação poderiam ser consideradas como vetores de impacto biológico (danos)?

Contextualização

O estabelecimento da linha de base pré-rompimento em relação aos contaminantes conta com escassos trabalhos relacionados à vegetação nativa da região. As áreas dos ecossistemas vegetais que foram mais fortemente atingidas pela erosão e deposição dos rejeitos de mineração devido ao rompimento da barragem de Fundão restringem-se à área entre a barragem de Fundão e a UHE Risoleta Neves. Vários trabalhos indicam que os vetores de impacto devido ao rejeito possam estar mais relacionados às alterações físicas e químicas,

não necessariamente relacionados ao potencial tóxico dos metais pesados (Santos et al. 2019).

Nem sempre o maior acúmulo de determinado elemento na planta, como no caso dos micronutrientes Fe, zinco (Zn), cobre (Cu) e Mn, resulta em efeitos tóxicos, uma vez que eles são considerados micronutrientes essenciais. Mesmo os elementos reconhecidamente tóxicos, como o As, chumbo (Pb), cromo (Cr), alumínio (Al), podem estar presentes no vegetal e não resultar em efeitos tóxicos, uma vez que os vegetais dispõem de mecanismos para imobilização desses elementos. Portanto, o limiar de toxicidade é muito difícil de ser definido, ainda mais em se tratando de espécies vegetais nativas da bacia do rio Doce. As espécies vegetais diferem significativamente em relação às exigências nutricionais e à tolerância e acúmulo dos diferentes metais (Afonso et al. 2020) e, mesmo não causando danos biológicos, podem ser agentes potenciais de biomagnificação na fauna.

Interessante considerar que as plantas são capazes de absorver concentrações elevadas de metais em áreas contaminadas e, a depender da translocação das raízes para a parte aérea, podem ser consideradas de risco devido ao potencial de magnificação na cadeia trófica ou como fitoestabilizadoras dos metais no sedimento, evitando a sua disponibilização para outros compartimentos, características desejáveis no fitomanejo de áreas impactadas (Nawab et al. 2015; Boechat et al. 2016; Christou et al. 2017)

Hipóteses & Predições

- A hipótese é que o dano biológico associado ao nível de contaminação varia conforme o tipo do contaminante e a espécie de planta.
- Espera-se que, mesmo em face do maior acúmulo de contaminantes nas plantas mantidas nas áreas afetadas pela deposição de rejeito (naturais ou em processo de restauração), isso não implica, necessariamente em risco/dano biológico e ecológico.
- Espera-se que diferentes espécies de plantas irão apresentar variação na tolerância aos contaminantes.

Indicador(es) proposto(s)

- Prevalência de dano biológico associado a contaminantes em tecidos de plantas terrestres.

Protocolos metodológicos

As mesmas amostras de material vegetal coletadas seguindo o mesmo protocolo metodológico da Pergunta 1 serão utilizadas para avaliação do dano biológico, uma vez que a indicação de análise de dano biológico pressupõe a prévia quantificação dos contaminantes nos compartimentos biológicos. Nesse sentido, o monitoramento do dano somente seria implementado caso sejam detectadas alterações significativas nas concentrações de elementos metálicos entre os indivíduos presentes nos fragmentos alvo na ADA e nos fragmentos de referência, buscando, assim, uma otimização de recursos e tempo.

Sendo implementado o monitoramento do plano em tecidos de plantas terrestres, as amostragens devem ser feitas na estação chuvosa e na estação seca. O monitoramento deve ter periodicidade semestral durante 5 anos. Dependendo dos resultados obtidos nas amostragens semestrais, após dois de monitoramento a coleta de dados poderá ser redimensionada para amostragens anuais ou mesmo encerrada caso fique demonstrada a ausência do efeito.

O indicador biológico sugerido para avaliação de danos é a alteração das membranas biológicas, por meio da determinação da concentração de malondialdeído (MDA). Quando presentes em elevadas concentrações no meio celular, os metais pesados induzem a formação descontrolada de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, os quais são considerados os principais agentes de danos celulares, especialmente nas membranas. Esse indicador, além de excelente dose-resposta, apresenta como vantagens a facilidade de determinação, aliada a um custo relativamente baixo. Destaca-se que, inicialmente, essas análises serão realizadas apenas em amostras de raízes e folhas onde ocorre maiores acúmulos de metais absorvidos e, a depender dos dados de concentração de metais pesados nos demais compartimentos das plantas, essas análises poderão ser ampliadas a fim de configurar a existência ou não de danos associados à presença dos elementos metálicos.

No procedimento analítico (Hodges et al. 1999), a peroxidação dos lipídios será mensurada pelo teste de reatividade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Para tanto, amostras vegetais congeladas serão maceradas em 2 mL de ácido tricloroacético 1% (TCA) (p/v) e centrifugadas a 10.000 g, por 15 min. Ao sobrenadante, seguirá a adição de ácido tiobarbitúrico 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e incubação a 95°C, por duas horas, seguido da leitura da absorvância a 532 nm. A concentração de MDA será calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em µmoles de MDA g⁻¹ massa fresca.

Pergunta 3 - Está ocorrendo contaminação por elementos químicos e consequentes danos em espécies de invertebrados e de pequenos vertebrados (anfíbios, répteis, roedores e marsupiais) que estão em contato direto com o rejeito?

Contextualização

É possível que em alguns ambientes ainda exista exposição e disponibilização de contaminantes provenientes do rompimento da barragem. Tais contaminantes, já mensurados em análises de água e sedimentos, como o Fe, Mn, As, Al, Cr e Pb, dentre outros, podem estar presentes nos ambientes aquáticos que se formaram ou persistiram sobre o rejeito depositado nas margens de drenagens, a exemplo de lagoas, poças, brejos e margens dos rios. Tais elementos, se biodisponíveis, podem contaminar indivíduos de organismos associados ao ambiente aquático (e.g., libélulas, girinos e cágados) e organismos terrestres e semifossoriais (e.g., besouros escarabaeíneos e pequenos mamíferos) além de organismos responsáveis por serviços essenciais como a polinização (e.g, abelhas). Assim, torna-se importante quantificar e monitorar as concentrações de eventuais contaminantes em indivíduos ou tecidos dessas espécies. A contaminação por metais pesados é um componente importante da poluição ambiental e se tornou, nas últimas décadas, um foco de preocupação em escala global (Sang et al. 2018). A informação acerca dos efeitos letais e sub-letais em processos gerais das comunidades e de grupos específicos como herbívoros, decompositores, polinizadores e predadores é essencial para entender os efeitos diretos e indiretos dos metais pesados nos ecossistemas via cadeias tróficas. As interações multi-tróficas entre plantas hospedeiras, insetos herbívoros e mutualistas, insetos predadores e ultimamente os insetos decompositores permitem entender a rota de transferência e acúmulo dos metais pesados em organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos. Estudos anteriores utilizando bioensaios demonstraram efeitos sub-letais e negativos da presença de contaminantes na performance de joaninhas predadoras (Sang et al. 2018, Du et al. 2019), de libélulas (Nummelin et al. 2007), de abelhas (Szentgyörgyi et al. 2017) e de lagartas de borboletas (Shepard et al. 2020), dentre outros (revisão em Sun et al. 2006).

O aumento da biodisponibilidade de metais e compostos metálicos no ambiente é preocupante do ponto de vista ecotoxicológico. Através da contaminação do solo e água, os metais encontrados nos rejeitos podem entrar nos sistemas biológicos e, assim, serem incorporados na cadeia alimentar. A eventual contaminação por metais pode causar danos aos tecidos e células onde se acumulam ou estão reativos, acentuando a ocorrência de estresse oxidativo e/ou inibindo a atividade enzimática que pode levar à expressão de genes aberrantes ou causar danos ao DNA. De fato, efeitos citogenotóxicos dos resíduos provenientes do rompimento da barragem de Fundão, especialmente de metais particulados, foram demonstrados por Quadra et al. (2019), indicando a necessidade de monitoramento desses impactos, viabilizando a implantação de estratégias de mitigação eficientes e um conhecimento profundo dos efeitos que ainda persistem no ecossistema.

Ainda, como fonte de evidência ecológica (morfológica) da eventual contaminação e de alterações físicas no sedimento de lagoas soterradas ou que se formaram sobre o sedimento, estudos que avaliem a frequência de malformações e a instabilidade no desenvolvimento (Lens et al. 2002, Szentgögyi et al. 2017) em organismos em contato direto e indireto com os contaminantes são ferramentas úteis na identificação, avaliação e monitoramento de impactos ambientais persistentes e recorrentes. A estabilidade no desenvolvimento é a habilidade de um genótipo em expressar repetidamente um único fenótipo quando o desenvolvimento ocorre sob as mesmas condições ambientais (Palmer & Strobeck 2003), ao passo que a instabilidade tende a aumentar em indivíduos expostos a altos níveis de stress durante o desenvolvimento (Kellner & Alford 2003, revisão em Beasley et al. 2013).

Para muitas características bilaterais parece que o programa genético especifica uma simetria perfeita, assim, desvios dessa simetria podem indicar uma instabilidade no desenvolvimento (Palmer & Strobeck 2003). A assimetria flutuante é amplamente utilizada para detectar a influência de perturbações no desenvolvimento das espécies, com foco especial em impactos antrópicos (Palmer 1994; Lens et al. 2002; Van Dongen 2006; Alford et al. 2007b; Van Poucke et al. 2007; Zachos et al. 2007). A assimetria flutuante pode variar ao longo da ontogenia, ou seja, indivíduos podem apresentar níveis de assimetria em diferentes idades ou estágios de desenvolvimento. Assim, a assimetria flutuante reflete o desenvolvimento recente do organismo (Kellner & Alford 2003). Em anuros, altas taxas de mortalidade têm sido observadas no estágio larval (girinos). Dessa maneira, considerando que indivíduos com altos níveis de instabilidade no desenvolvimento devem ser selecionados negativamente (Møller 1997; López et al. 2002; Söderman et al. 2007), pode-se assumir que a detecção de elevados níveis de instabilidade no desenvolvimento, que reflitam os impactos ambientais, seria mais provável no estágio larval. Isso resultaria devido ao fato de que mais indivíduos assimétricos (aqueles com uma baixa capacidade de controlar seu desenvolvimento) estariam mais susceptíveis a morrer antes de completar sua metamorfose, ou seja, indivíduos mais simétricos tenderiam a viver mais (Møller 1997).

Hipóteses & Predições

- A hipótese geral é que a presença do rejeito provoca aumento nos níveis de contaminação por metais tóxicos em espécies de abelhas, libélulas, besouros escarabaeíneos e pequenos vertebrados associados a ambientes aquáticos e terrestres.
- Espera-se que os níveis de contaminação nas espécies de insetos e pequenos mamíferos de hábito terrestre e semifossorial seja maior nas áreas de vegetação diretamente impactadas pela presença de rejeito quando comparada com áreas de referência.

- Indivíduos de espécies de pequenos mamíferos que estejam em contato com eventuais elementos contaminantes no rejeito apresentarão taxas mais elevadas de malformações e danos histopatológicos quando comparados às taxas em áreas de referência.
- Espera-se que girinos que se desenvolvem em contato direto com o rejeito proveniente do rompimento da barragem estejam sendo contaminados por elementos químicos. Neste caso, a concentração de contaminantes será maior em girinos provenientes da área diretamente afetada quando comparada àquela de girinos provenientes de áreas de referência.
- Girinos que se desenvolvem em contato direto com o rejeito (áreas alvo) estão mais susceptíveis a malformações e desvios de simetria quando comparados aos girinos de áreas não afetadas (referência). Espera-se que níveis maiores de stress ambiental durante o desenvolvimento, seja químico (contaminação) ou físico (e.g. alteração física do sedimento), aumentem as taxas de malformações e assimetria. Neste caso, a proporção de indivíduos com malformações e a intensidade da malformação será maior em populações provenientes da área diretamente afetada (i.e. em contato direto com rejeito) quando comparada àquelas provenientes de áreas não afetadas (referência).
- Indivíduos de cágado-de-barbichas (*Phrynops geoffroanus*) que vivem na calha do rio, em contato direto com o rejeito e água provenientes do rompimento, deverão estar contaminados por elementos químicos, e estes níveis de contaminação devem diminuir com a distância da barragem de Fundão, fonte do impacto. Para esta hipótese, espera-se que a concentração de contaminantes será maior em cágados provenientes de trechos diretamente afetados (alvo) quando comparada àquela de cágados provenientes de trechos não afetados (referência) e diminuirá ao longo da calha do rio em direção à foz do rio Doce.
- Considerando-se a confirmação da hipótese anterior, a maior contaminação de indivíduos nos trechos alvo estaria associada a danos teciduais com maior frequência e intensidade, em girinos e no cágado-de-barbichas (*Phrynops geoffroanus*) de trechos contaminados.

Indicador(es) proposto(s)

- Concentração de contaminantes em abelhas, libélulas e besouros escarabaeíneos;
- Concentração de contaminantes em tecidos de girinos;
- Prevalência de danos, malformações e desvios de simetria em girinos;
- Concentração de contaminantes em tecidos de indivíduos de *Phrynops geoffroanus*;
- Prevalência de danos em indivíduos de *Phrynops geoffroanus*.
- Concentração de contaminantes em tecidos de espécies de pequenos mamíferos terrestres;
- Prevalência de malformações e dano histopatológico em pequenos mamíferos terrestres;

Protocolos metodológicos

1. Contaminação em insetos

Para verificar se está ocorrendo contaminação por elementos químicos em insetos generalistas de habitat que utilizam distintos recursos em áreas em contato direto com o rejeito, deverão ser amostrados 40 fragmentos no trecho até a UHE Risoleta Neves, sendo 20 localizados na ADA e 20 fora do buffer de 300 m da ADA (referência), ou seja, que não tiveram contato com o rejeito. Serão consideradas espécies generalistas de

habitat espécies amostradas com pelo menos 30 indivíduos por fragmento, considerando-se todos os transectos de cada fragmento como réplicas dos tratamentos e cada fragmento como unidade amostral. Tais espécies de abelhas, besouros escarabeíneos e libélulas, selecionadas de acordo com esse critério, deverão ser utilizadas para as análises de contaminantes. Os pontos devem estar localizados de preferência na mesma sub-bacia e serão utilizados indivíduos adultos das espécies indicadas como generalistas de habitat. Em cada fragmento serão realizadas amostragens de abelhas e besouros escarabeíneos utilizando transectos como unidades amostrais, sendo um transecto na borda e outro transecto no interior do fragmento, distante pelo menos 100 m da borda. Cada transecto possui uma extensão de 200 m. Para a amostragem de libélulas, serão usados transectos de 200 m, na borda dos fragmentos, paralelos à margem dos rios. Para detalhes do procedimento amostral veja pergunta 5 com o delineamento completo para amostragem de insetos.

O monitoramento deverá ter periodicidade anual, durante as estações chuvosas e com duração inicial de dois anos. Caso seja verificada uma maior concentração de metais em insetos nos trechos impactados, quando comparados aos trechos de referência, o monitoramento desses parâmetros deverá continuar anualmente, por 10 anos. Caso não seja verificada a contaminação ou danos teciduais em indivíduos amostrados nos trechos-alvo, o projeto será encerrado ao final do segundo ano.

Para as análises de contaminantes sugere-se o uso de insetos de três guildas alimentares distintas. Libélulas (Odonata) são insetos predadores com fase larval aquática e adulta terrestre, que podem se contaminar diretamente na água na fase de ninfa ou indiretamente a partir da alimentação de outros insetos contaminados. Besouros escarabeíneos (Coleoptera, Scarabaeinae) são insetos detritívoros que forrageiam e nidificam no solo, que podem se contaminar diretamente no solo ou indiretamente através do uso de fezes ou carcaças de animais contaminados. As abelhas (Hymenoptera) são responsáveis pela polinização, e podem se contaminar diretamente pelo contato com o solo (espécies que nidificam no solo) ou indiretamente através do uso de pólen de plantas presentes em áreas contaminadas por metais (veja Oliveira et al. 2020).

2. Contaminação, danos, malformações e desvios de simetria em girinos

Amostragem

Para verificar se está ocorrendo contaminação por elementos químicos, danos, malformações e desvios de simetria em girinos que se desenvolvem em contato direto com o rejeito, deverão ser amostrados 20 pontos amostrais no trecho até a UHE Risoleta Neves, sendo 10 localizados na ADA (área alvo - corpo d'água lânticos, afetado e que ainda tenha rejeito depositado em seu sedimento) e 10 fora da ADA, ou seja do *buffer* de 500 m da ADA (referência), ou seja, que não tiveram contato com o rejeito. Os pontos devem estar localizados de preferência na mesma sub-bacia e devem corresponder a poças, lagoas e brejos que abriguem espécies comuns e abundantes de anfíbios. Cada lagoa deve distanciar pelo menos 500 m uma da outra.

A partir de um mapeamento visual, utilizando-se imagens de satélite de 2020 (*Google Earth*), foram apontados 20 pontos (lagoas/brejos) que constituem potenciais unidades amostrais (Tabela 8, Figura 17, Anexo 7). Entretanto, para a escolha das unidades amostrais, essas lagoas deverão ser inspecionadas e validadas em campo, em etapa prévia à amostragem. Deverão ser evitadas lagoas que tenham como finalidade principal a piscicultura ou que sejam bebedouros de gado localizados no meio do pasto e totalmente desprovidos de

vegetação emersa ou marginal, já que esses ambientes tendem a apresentar comunidades de anfíbios muito empobrecidas. Ainda, restrições relacionadas ao acesso e permissão dos proprietários deverão ser avaliadas previamente ao início das amostragens. Na Tabela 9, são apresentados pontos alternativos que podem ser utilizados para substituir algum dos pontos sugeridos, caso não venha a ser validado em campo. Para inspeção e validação das lagoas deverão ser realizadas duas campanhas com a duração aproximada de 20 dias, cada. As lagoas deverão ser inspecionadas durante o dia e à noite, quando a ocorrência das espécies deverá ser avaliada por meio do reconhecimento da sua vocalização e amostragem de girinos. É importante que, se não todas, a maioria das lagoas abriguem as três espécies alvo selecionadas para o estudo (ver abaixo).

As amostragens (bem como a validação dos pontos em campo) devem ser realizadas impreterivelmente durante a estação chuvosa (i.e. outubro a fevereiro), época em que os girinos da maioria das espécies estão presentes em maior abundância. Devem ser realizadas quantas campanhas forem necessárias para se obter o número amostral designado. Prevê-se um profissional dedicado a essa função, desde meados de outubro até fevereiro.

O monitoramento deverá ter periodicidade anual, durante as estações chuvosas e com duração inicial de dois anos. Caso seja verificada uma maior concentração de metais, bem como maior incidência de danos histopatológicos, malformações ou desvios de simetria em girinos nos trechos impactados, quando comparados aos trechos de referência, o monitoramento desses parâmetros deverá continuar anualmente por 10 anos. Caso não seja verificada a contaminação ou danos teciduais em indivíduos de trechos alvo, o projeto será encerrado ao final do segundo ano.

Para as avaliações de contaminação, danos, malformações e desvios de simetria deverão ser selecionadas três espécies comuns, bem distribuídas e abundantes na área de estudo. Os girinos deverão ser coletados manualmente, com auxílio de peneiras e identificados em campo. Exemplo de espécies que ocorrem na área e atendem a esses critérios são: *Physalaemus cuvieri*, *Dendropsophus minutus*, *Rhinela pombali*, *Elaschistocleis cesari*, *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus latrans*, *Boana crepitans*, *Boana faber* e *Boana albopunctata*. A seleção das espécies deverá ser realizada em campo, mas respeitando o número mínimo de três espécies.

Tabela 8: Potenciais pontos amostrais (lagoas/brejos) sugeridos para a avaliação de contaminação, danos, malformações e desvios de simetria em girinos em áreas afetadas (alvo) e de referência.

Ponto	Coordenadas UTM 23K		Categoria
PA01	670656	7759597	afetada
PA02	673572	7761034	afetada
PA03	674238	7759438	afetada
PA04	674659	7757301	afetada
PA05	676118	7757644	afetada
PA06	677811	7757255	afetada
PA07	679392	7756024	afetada
PA08	682024	7754814	afetada
PA09	684001	7754674	afetada
PA10	685307	7753490	afetada
PR11	667198	7763770	referência

Ponto	Coordenadas UTM 23K		Categoria
PR12	667017	7758333	referência
PR13	669640	7758955	referência
PR14	672753	7759569	referência
PR15	678512	7759360	referência
PR16	679873	7758337	referência
PR17	679709	7754195	referência
PR18	680738	7756210	referência
PR19	682556	7752735	referência
PR20	686033	7751417	referência

Figura 17: Localização dos potenciais pontos amostrais (lagoas/brejos) sugeridos para a avaliação de contaminação, danos, malformações e desvios de simetria em girinos em áreas afetadas e de referência.

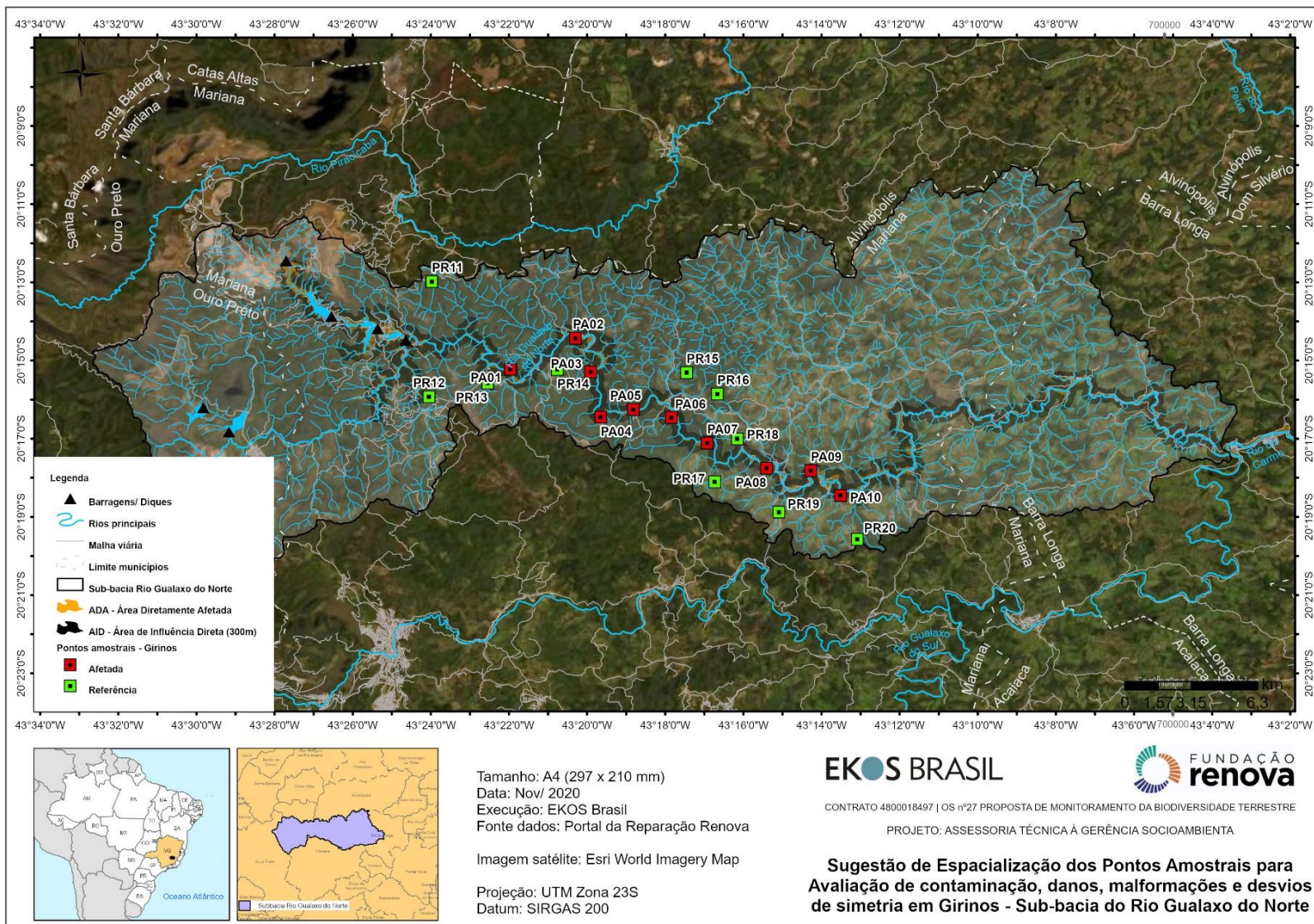


Tabela 9: Potenciais pontos amostrais (lagoas/brejos) alternativos sugeridos para a avaliação de contaminação, danos, malformações e desvios de simetria em girinos em áreas afetadas e de referência.

Coordenadas UTM 23K		categoria
687829	7754676	afetada
683141	7753881	afetada
682705	7754327	afetada
674843	7759764	afetada
673931	7760279	afetada
674111	7760892	afetada
671127	7759018	afetada
672584	7759455	referência
679600	7758134	referência
678771	7758215	referência
677776	7758997	referência
677602	7758840	referência
678157	7760311	referência
678247	7760712	referência
679343	7759476	referência
678686	7759313	referência
682874	7760304	referência
682990	7760410	referência
683547	7759604	referência
680699	7756356	referência
681443	7758538	referência
680900	7764842	referência
681195	7764256	referência
681009	7764111	referência
680652	7754212	referência
682200	7751820	referência
684329	7750827	referência
689728	7753101	referência
690215	7754613	referência
689338	7756834	referência
687108	7758827	referência
688387	7759058	referência
690210	7760229	referência
685895	7757575	referência
686148	7757272	referência
667176	7755452	referência
667355	7755729	referência
667162	7755142	referência

Coordenadas UTM 23K		categoria
680106	7763927	referência
683682	7763419	referência
683950	7763842	referência
684393	7763710	referência
684364	7765537	referência
684193	7760155	referência
672693	7759603	referência
667304	7757827	referência
666535	7763276	referência
686448	7762567	referência

Aproximadamente 200 girinos por espécie serão coletados para verificação de acúmulo de metais e alterações teciduais decorrentes do contato direto com o rejeito. Destes, 100 indivíduos serão utilizados para as análises de bioacumulação de metais e 100 girinos para histopatologia e análise de marcadores de estresse oxidativo. Idealmente, devem ser amostrados 10 indivíduos por espécie em cada ponto, sendo 100 provenientes de pontos afetados e 100 de referência. Os girinos deverão estar, impreterivelmente, em estágios de desenvolvimento medianos, antes de iniciarem a reestruturação do intestino e absorção da cauda (i.e. estágios 31 a 39, segundo Gosner, 1960) (Krohn et al 2020). Assim, se em um ponto, em determinado momento, forem encontrados apenas girinos recém eclodidos, será necessário retornar a esse ponto em intervalos regulares de tempo até que as larvas possam ser coletadas em estágio adequado.

Assimetria e malformações

Para as análises de assimetria flutuante (AF) e malformações em girinos deverão ser analisados 200 indivíduos por espécie (10 indivíduos por espécie em cada ponto), sendo 100 provenientes de pontos afetados e 100 de pontos referência. Os girinos deverão estar nos estágios 35-39 de desenvolvimento (Gosner, 1960). Os girinos deverão ser fixados em formol 10% e, portanto, não podem ser os mesmos que serão utilizados pelas análises de contaminação e danos.

Para cada girino serão medidos quatro atributos morfológicos bilaterais: distância narina-focinho, distância olho-narina, comprimento do olho e largura do olho, além do comprimento total e estágio de desenvolvimento. As medidas devem ser realizadas com o auxílio de software, baseado em fotografias dos girinos obtidas usando uma plataforma ajustável imersa em água. As diferenças na AF serão avaliadas de acordo com o protocolo proposto por Palmer & Strobeck (1986).

Malformações serão avaliadas utilizando-se os mesmos indivíduos utilizados nas análises de AF. Serão avaliadas malformações relacionadas ao aparato oral dos girinos, visto que estudos prévios indicam que contaminantes podem causar modificações nessas estruturas (Babini et al., 2015; Pérez-Iglesias et al., 2017). Será atribuída uma pontuação específica para cada uma das 3 condições observadas nos bicos córneos e fileiras de denticulos dos girinos, baseado em Amaral et al. (2018). (1) Girinos com ambos os bicos córneos

íntegros pontuarão 3, aqueles que apresentarem alterações em apenas um dos bicos córneos pontuarão 2 e girinos sem ambos os bicos pontuarão 3. (2) Girinos com bicos córneos com pigmentação escura pontuarão 3, aqueles que apresentarem despigmentação em um ou dois bicos pontuarão 2 e 1, respectivamente e girinos sem pigmentação em ambos os bicos córneos pontuarão 0. (3) Girinos que apresentarem fileiras de denticulos labiais (LTR) intactas pontuarão 3, aqueles que apresentarem uma LTR incompleta ou alterada pontuarão 2, girinos sem uma das LTR ou com duas ou mais fileiras incompletas ou alteradas pontuarão 1 e girinos sem nenhuma LTR pontuarão 0.

As inspeções deverão ser realizadas com o auxílio de estéreo microscópio. Pequenas adaptações metodológicas poderão ser realizadas dependendo da fórmula das LTR das espécies que forem analisadas. É importante pontuar que algumas espécies não se adequarão a essa metodologia, como por exemplo, os girinos de Microhylidae, que não possuem estruturas queratinizadas em seu aparto oral.

3. Contaminação e danos em *Phrynops geoffroanus*

Amostragem

Para avaliar a contaminação em *Phrynops geoffroanus* serão amostrados 13 trechos, sendo 7 Alvo (diretamente afetados) e 6 de Referência (não afetados) ao longo da bacia do rio Doce. É importante destacar que os trechos amostrados precisam estar localizados a pelo menos 1 km de distância dos trechos amostrados no projeto de monitoramento populacional da espécie. Os trechos alvo correspondem a trechos dos rios Gualaxo do Norte, Carmo e Doce diretamente afetados pelo rejeito. Os trechos alvo serão distribuídos em 3 porções da bacia: 3 trechos entre Fundão – UHE Risoleta Neves, 2 trechos entre a UHE Risoleta Neves – UHE Baguari, 2 trechos entre a UHE Baguari – foz do rio (Tabela 10, Figura 18, Anexo 8). Os trechos devem estar o mais distantes possível um do outro, respeitando a distância mínima de 15 km na porção Fundão – UHE Risoleta Neves e de 50 km nas demais porções.

Os trechos referência, por sua vez, devem estar em rios da bacia do rio Doce não afetados pelo rejeito. Apontase os seguintes rios para abrigar os trechos referência: Carmo (trecho a montante da sua confluência com o Gualaxo do Norte), Piracicaba, Santo Antônio, Caratinga, Manhuaçu, Pancas, sendo um trecho em cada rio (Figura 18). Entretanto, trechos referência podem corresponder a qualquer um dos demais principais tributários do rio Doce: Piranga, Casca, Matipó, Suaçuí Grande, em Minas Gerais, Guandu, Santa Joana, no Espírito Santo. Os trechos referência podem estar localizados em qualquer altura dos rios supracitados, desde que distantes pelo menos 10 km de trechos diretamente afetados, de maneira a excluir potenciais efeitos indiretos do rompimento. A definição precisa da localização dos trechos amostrais deverá ser realizada em campanha de campo que deve ser realizada etapa prévia à amostragem propriamente dita, quando características do rio, acessos às margens, navegabilidade (quando for o caso) e permissão de proprietários devem ser avaliadas.

Tabela 10: Trechos de rios onde deverão ser realizadas as amostragens para a avaliação de contaminação e danos no cágado-de-barbichas *Phrynos geoffroanus* na bacia do rio Doce.

Trecho	Categoria	Rio	Localização
TA01	Alvo	Gualaxo do Norte	Entre Fundão e a confluência do rio Gualaxo do Norte com rio do Carmo
TA02	Alvo	Carmo	Entre a confluência do rio Gualaxo do Norte com rio do Carmo e a confluência com o rio Piranga.
TA03	Alvo	Doce	Entre a confluência do rio Gualaxo do Norte com o rio do Carmo e a UHE Risoleta Neves
TA04	Alvo	Doce	Entre a UHE Risoleta Neves até a confluência do rio Piracicaba
TA05	Alvo	Doce	Entre a confluência do rio Piracicaba e a UHE Baguari
TA06	Alvo	Doce	Entre a UHE Baguari e a UHE Mascarenhas
TA07	Alvo	Doce	Entre a UHE Mascarenhas e a foz do rio Doce
TR08	Referência	Carmo	Qualquer trecho do rio do Carmo localizado 10 km a montante da sua confluência com o rio Gualaxo do Norte
TR09	Referência	Piracicaba	Qualquer trecho do rio Piracicaba localizado 10 km a montante da sua confluência com o rio Doce
TR10	Referência	Santo Antônio	Qualquer trecho do rio Santo Antônio localizado 10 km a montante da sua confluência com o rio Doce
TR11	Referência	Caratinga	Qualquer trecho do rio Caratinga localizado 10 km a montante da sua confluência com o rio Doce
TR12	Referência	Manhuaçu	Qualquer trecho do rio Manhuaçu localizado 10 km a montante da sua confluência com o rio Doce
TR13	Referência	Pancas	Qualquer trecho do rio Pancas localizado 10 km a montante da sua confluência com o rio Doce

Figura 18: Trechos de rios onde deverão ser realizadas as amostragens para a avaliação de contaminação e danos no cágado-de-barbichas *Phrynops geoffroanus* na bacia do rio Doce.



Em cada trecho, deverão ser instaladas entre quinze e vinte armadilhas do tipo covo para a captura de quelônios. As armadilhas serão instaladas em pontos que reúnam características adequadas para a captura de cágados, ou seja, que estejam localizados em locais profundos e com pouca correnteza (poções ou remansos), próximos a troncos, pedras e galhadas emersas, em margens com vegetação marginal e pouco indício de utilização por humanos. As armadilhas deverão estar espaçadas cerca de 30 metros umas das outras. Cada conjunto de 20 armadilhas deve ocupar um trecho de cerca de 600 metros, considerando o espaçamento indicado. Os covos ficarão abertos durante o número de dias necessário para que se capturem 10 indivíduos por trecho amostral. As armadilhas poderão, caso necessário, ser realocadas a cada dois dias, ao invés de permanecerem estacionadas no mesmo ponto, caso nenhum indivíduo seja capturado nos dois primeiros dias. De acordo com o primeiro ano da Avaliação Ecológica Rápida (Bicho do Mato Meio Ambiente, 2019) o sucesso de captura de *P. geoffroanus* variou bastante entre diferentes trechos e afluentes da bacia. Dessa maneira, para assegurar a captura dos 10 indivíduos adultos por área amostral, pode ser necessário que a equipe tenha que se deslocar dentro de um determinado trecho em busca de áreas onde a espécie seja mais abundante.

As armadilhas serão iscadas com lata de sardinha em conserva de óleo perfuradas. A isca deverá ser trocada diariamente. As armadilhas serão instaladas pela manhã/tarde e checadas na manhã seguinte. Em locais com grande taxa de roubo, as armadilhas poderão ser instaladas à tarde, no horário mais avançado possível, mas de maneira que todas as armadilhas possam ser instaladas antes do anoitecer e retiradas na manhã seguinte, o mais cedo possível, para diminuir as chances de furto. Em vários trechos de rio, a instalação e conferência de armadilhas deverá ser realizada com auxílio de um pequeno barco de alumínio e motor de pouca potência compatível com a navegabilidade do trecho do rio, o que facilitará o acesso de ilhas e locais com menor acesso de pessoas. Será, portanto, necessário contar com um piloto com carteira de arrais para a condução da embarcação.

Na hipótese de um baixo sucesso de captura, deve se avaliar a necessidade da utilização de métodos de captura complementares de maneira a aumentar o esforço amostral. Se necessário, para viabilizar a captura dos 10 indivíduos por localidade, devem ser usados espinheis iscados com pedaços de carne ou tripa de galinha e redes de emalhar.

As amostragens deverão ser realizadas em qualquer época do ano. A sazonalidade não é um fator a ser considerado no que tange os objetivos relacionados à avaliação da contaminação. Deverão ser realizadas quantas campanhas forem necessárias para se obter o número amostral designado (mínimo de 10 indivíduos por trecho).

O monitoramento deverá ter periodicidade anual e com duração inicial de dois anos. Caso seja verificada uma maior concentração de metais, bem como maior incidência de danos histopatológicos, malformações ou desvios de simetria em girinos nos trechos alvo, quando comparados aos trechos de referência, o monitoramento desses parâmetros deverá continuar anualmente por 10 anos. Caso não seja verificada a contaminação ou danos teciduais em indivíduos de trechos alvo, o projeto será encerrado ao final do segundo ano.

4. Contaminação e danos em pequenos mamíferos, anfíbios e répteis

A avaliação de contaminação e danos em pequenos mamíferos, anfíbios adultos e répteis squamata será feita em três regiões distintas. Pequenos mamíferos serão avaliados nos fragmentos florestais do trecho Fundão-UHE Risoleta Neves, em ilhas fluviais próximas à foz do rio Doce e em restingas associadas à foz. A avaliação da contaminação e de danos em anfíbios adultos e répteis squamata deverá ser feita apenas nas restingas da foz do rio Doce. Para as avaliações de contaminação e danos em espécies da herpetofauna deverão ser selecionadas duas espécies comuns (de preferência uma espécie de anfíbio e outra de lagarto), bem distribuídas e abundantes nas áreas amostrais. Deverão ser coletados pelo menos 10 indivíduos por área amostral em cada período. Para pequenos mamíferos serão coletadas amostras de pelo menos 10 indivíduos de três espécies dentre as mais abundantes em cada região, de hábito terrestre, semifossorial ou semiaquático. A definição das espécies da herpetofauna e de pequenos mamíferos deverá ser feita em campo, em amostragens piloto, ou a partir dos dados de coleta da Avaliação Ecológica Rápida (AER).

Para avaliação da contaminação e danos em espécies de pequenos mamíferos no trecho Fundão-UHE Risoleta Neves serão amostrados os 40 sítios indicados no tópico de definição da malha amostral, sendo 20 fragmentos Alvo e 20 fragmentos Referência. Em cada fragmento florestal serão estabelecidos dois transectos, sendo um na borda do fragmento e outro no interior, a uma distância mínima de 100 metros. Em cada transecto serão definidos 15 postos de captura, equidistantes cerca de 15 metros entre si. Em cada posto serão instaladas duas armadilhas de captura viva (*live trap*), uma do modelo gaiola de arame galvanizado (tipo gancho) (32x15x15 cm) e outra modelo *Sherman* (25x8x9 cm). Uma armadilha será disposta no solo e a outra, sempre que possível, em média altura (cerca de 1,5 m), presa em galhos ou cipós. As armadilhas de captura viva serão iscadas com farinha de milho, banana e farinha de amendoim e serão vistoriadas a cada manhã tendo as iscas renovadas após cada captura ou sempre que necessário. Adicionalmente em cada transecto serão instalados um conjunto de 10 armadilhas de interceptação e queda (*Pitfall traps*) constituído de baldes de 60 l em linha, interligados por lona. As armadilhas ficarão operantes durante cinco noites consecutivas, por campanha, quando então serão retiradas ou tampadas. Para a coleta de amostras para avaliação de contaminantes as campanhas de campo deverão ser semestrais, acompanhando a periodicidade das coletas relativas ao protocolo metodológico da Pergunta 6. As coletas deverão ter uma periodicidade semestral (estação seca e chuvosa) e duração programada de no mínimo 5 anos, sendo analisados os resultados ao final do segundo ano para avaliação da continuidade do monitoramento de contaminantes.

Para verificar se está ocorrendo contaminação por elementos químicos e danos histológicos e bioquímicos em espécies da herpetofauna e de pequenos mamíferos das restingas potencialmente afetadas pela deposição de rejeito, deverão ser amostradas 6 áreas, sendo 3 restingas localizadas ao norte e 3 ao sul da foz do rio Doce, selecionadas dentre aquelas já amostradas no âmbito do monitoramento do PG28. As áreas deverão estar localizadas na porção das restingas próximas ao litoral e estabelecidas distanciando-se a partir da foz. Em cada uma das restingas serão estabelecidos dois transectos de coleta de pequenos mamíferos, distantes pelo menos 100 metros entre si. Em cada transecto serão instalados 15 postos de captura distantes de 10 a 15 metros um do outro. Em cada posto de captura serão instaladas duas armadilhas, uma modelo gaiola e outra de modelo *Sherman*. As armadilhas de captura viva serão iscadas com farinha de milho, banana e farinha de amendoim e serão vistoriadas a cada manhã tendo as iscas renovadas após cada captura ou sempre que necessário. Em cada restinga deverão ser instalados também dois transectos, cada um com 15 armadilhas de interceptação e queda (*Pitfall traps*) constituído de baldes de 60 l em linha, interligados por lona, perfazendo 30 *pitfalls* por restinga. As armadilhas ficarão operantes durante cinco noites consecutivas, por campanha, quando então

serão retiradas. As armadilhas *pitfall* deverão ser checadas duas a três vezes ao dia, evitando que as espécies capturadas durante o dia sejam mortas pelo sol. A coleta de espécimes da herpetofauna nas restingas será realizada também por meio de busca ativa que deverá ocorrer em trilhas aleatórias percorridas lentamente a pé. Para a busca ativa as amostragens diurnas devem ocorrer entre 9:00 e 16:00 h e as noturnas entre 19:00 e 24:00 h. Os espécimes devem ser capturados manualmente ou com auxílio de elásticos. As amostragens nas áreas de restinga deverão ser realizadas durante a estação chuvosa (novembro a janeiro) quando a maior parte das espécies da herpetofauna está em atividade. As amostragens nas áreas de restinga deverão ser realizadas anualmente na estação chuvosa (novembro a janeiro) quando a maior parte das espécies da herpetofauna está em atividade. A duração do monitoramento deve ser de 5 anos, porém se após o segundo ano não forem detectadas variações significativas nas concentrações de contaminantes o monitoramento poderá ser encerrado. Os espécimes de espécies que não forem alvo da avaliação de dano deverão ser identificados e soltos no local da coleta.

Para avaliar a contaminação em espécies de pequenos mamíferos nas ilhas fluviais deverão ser amostradas 5 ilhas próximas da foz do rio Doce, preferencialmente dentre aquelas já amostradas na Avaliação Ecológica Rápida (AER). Como comparativo, deverão ser amostrados 3 fragmentos florestais de referência na região próxima à foz, mas distantes do leito do rio Doce. Em função da quase inexistência de habitats reprodutivos para herpetofauna nas ilhas e considerando o sucesso de capturas de répteis e anfíbios extremamente baixo durante a Avaliação Ecológica Rápida (apenas 9 indivíduos de 4 espécies nas ilhas), não foi indicada aqui a amostragem de herpetofauna em ilhas fluviais. Em cada uma das ilhas e nos fragmentos florestais de referência serão estabelecidos dois transectos de coleta de pequenos mamíferos, distantes pelo menos 100 metros entre si. Em cada transecto serão instalados 15 postos de captura distantes de 10 a 15 metros um do outro. Em cada posto de captura serão instaladas duas armadilhas, uma modelo gaiola e outra de modelo Sherman. As armadilhas de captura viva serão iscadas com farinha de milho, banana e farinha de amendoim e serão vistoriadas a cada manhã tendo as iscas renovadas após cada captura ou sempre que necessário. Adicionalmente em cada transecto serão instalados um conjunto de 10 armadilhas de interceptação e queda (*Pitfall traps*) constituído de baldes de 60 l em linha, interligados por lona. As armadilhas ficarão operantes durante cinco noites consecutivas quando então serão retiradas ou tampadas. Nas ilhas fluviais e fragmentos de referência a amostragem deverá ser realizada após a estação chuvosa quando as condições de acesso às ilhas forem adequadas. O monitoramento terá periodicidade anual com a duração inicial de dois anos. Caso seja verificada uma maior concentração de metais ou danos em espécimes provenientes de áreas localizadas mais próximas à foz, quando comparados às de pontos mais distantes, ou maior concentração ou danos em espécimes de ilhas quando comparados com aqueles coletados nas áreas de referência, o monitoramento desses parâmetros deverá continuar sendo realizado anualmente, até completar 10 anos. O monitoramento terá periodicidade anual com a duração inicial de cinco anos, porém se após o segundo ano não forem detectadas diferenças na concentração de metais ou danos em espécimes de ilhas quando comparados com aqueles coletados nos fragmentos de referência, o monitoramento poderá ser encerrado.

5. Protocolos para preparação de amostras e análises histológicas e químicas

Avaliação de contaminantes no solo, água e sedimentos

As análises dos níveis de contaminação por metais no solo seguem os procedimentos metodológicos descritos na Pergunta 1, deixando claro novamente que as amostras de solo devem ser coletadas nos mesmos locais de coleta dos animais. Assim, em cada transecto de cada sítio amostral devem ser coletadas três amostras de solo, sendo uma no início, uma no meio e uma no final do transecto.

Para a associação entre a potencial contaminação em organismos de hábito aquático (girinos e cágado) e as concentrações de metais na água e sedimentos, deverão ser coletadas amostras em cada um dos trechos nos quais os animais estão sendo coletados. Os protocolos para padronização das coletas de água e sedimento e o detalhamento das melhores técnicas de coleta e armazenamento das amostras segue o descrito no protocolo de análises químicas do solo na Pergunta 1.

A coleta para avaliação de sedimentos deve ocorrer nas áreas de deposição de sedimentos finos (argila), que é onde os contaminantes são retidos. Em lagos, reservatórios e estuários, o acúmulo de partículas finas ocorre na região mais profunda; em rios, ocorre nas margens deposicionais e nas áreas de remansos. Ocorre variação tanto vertical como horizontal dos contaminantes, sendo necessário uma coleta de 3 a 5 amostragens. O ideal é fazer uma amostragem prévia para definir melhor este número de amostras. Para caracterização dos contaminantes, uma única coleta anual no período de seca pode ser suficiente, uma vez que no período de chuva ocorre uma variação no posicionamento de possíveis contaminantes, devido ao grande fluxo de água que revolve o sedimento.

Amostras de sedimentos também podem ser obtidas por mergulhadores em grandes riachos e corpos d'água abertos, como lagoas, lagos e oceanos. Dependendo dos métodos de amostragem usados e das análises necessárias, as amostras podem ser coletadas diretamente em recipientes adequados ou podem ser colocados em frascos após a coleta.

Precauções devem ser tomadas ao coletar amostras de sedimentos, uma vez que o sedimento pode conter produtos químicos que apresentam toxicidade específica. Estes procedimentos devem ser realizados por um profissional experiente. Deve ser tomado um cuidado especial para não contaminar as amostras. Isso inclui o armazenamento de amostras em um local seguro para evitar condições que possam alterar suas propriedades. As amostras devem ser seladas durante o armazenamento ou transporte de longo prazo.

Considerando que o sedimento e corpo d'água não tenham compostos orgânicos voláteis em quantidades perigosas, as amostras podem ser coletadas diretamente com um amostrador do tipo En Core® ou seringa. Se usar seringas, a amostra deve ser colocada no recipiente coletor (frasco pré-preparado de 40 ml) imediatamente. Ao amostrar diretamente com o amostrador En Core®, o frasco deve ser imediatamente tampado e travado. Após a coleta, a amostra deve ser imediatamente etiquetada e armazenada em uma caixa de gelo e resfriada.

Independentemente do método usado, se faz necessário tomar precauções para garantir que a amostra coletada seja representativa do corpo de água investigado. A carga total de sedimentos é transportada por água corrente de diferentes maneiras. As fases do transporte de sedimentos em geral ocorrem em um fluxo, onde a carga total de sedimentos é geralmente dividida em duas categorias, a carga suspensa e a carga de leito. A

carga suspensa é composta por partículas finas e é uma carga de lavagem. Como está em suspensão, é transportado rapidamente pelo fluxo. A carga de leito pode ser ainda dividida em carga de contato e carga de saltação. O tamanho e a concentração de sedimentos em um riacho geralmente aumentam da superfície para o leito, mas também varia transversalmente em uma seção de rio. E variam de acordo com o fluxo d'água.

O primeiro estágio da amostragem de sedimentos em um rio é a seleção de um local de amostragem adequado (habitat da fauna a ser analisada). O amostrador deve ser simples e portátil para evitar perturbação do fluxo. A velocidade de influxo na boca do amostrador deve ser igual à velocidade do fluxo. A boca do amostrador deve sempre estar voltada para a direção da corrente e o enchimento deve ser suave. O amostrador também deve ser capaz de coletar amostras nas profundidades desejadas.

É preciso considerar que todo corpo d'água é heterogêneo e que, seja qual for o local de amostragem, este não é totalmente representativo de todo o sistema em estudo. É fundamental que as características físicas, geológicas e hidrológicas, entre os pontos a serem comparados sejam compatíveis. Assim, dados como granulometria, teor de matéria orgânica e umidade do sedimento, tipo e grau de preservação da cobertura vegetal da margem, tipo de hábitat amostrado e ordem do rio devem ser similares entre o ponto de referência e os pontos a serem diagnosticados. São definidas as condições consideradas ideais, estabelecendo-se valor ou faixa de valor, para cada parâmetro, que seria esperado em um ambiente preservado.

Qualquer que seja o tipo de ambiente amostrado (rios, lagos, reservatórios, estuários e oceanos), a coleta para avaliação da qualidade de sedimentos (biológica, física e química) geralmente ocorre nas áreas de deposição de sedimentos finos (argila), já que normalmente são nesses locais que os contaminantes são retidos e a comunidade bentônica é mais desenvolvida e a cadeia trófica é bem estabelecida. Em lagos, reservatórios e estuários o acúmulo de partículas finas ocorre na região mais profunda; em rios, nas margens deposicionais e nas áreas de remansos. A margem deposicional localiza-se no lado oposto ao da erosional, apresentando declive mais suave e, muitas vezes, bancos de macrófitas enraizadas.

Em estudos de sedimentos são considerados essenciais a avaliação dos seguintes parâmetros: pH (potencial hidrogeniônico), Eh (potencial redox), conteúdo orgânico (carbono orgânico total - COT ou resíduos voláteis), sulfetos volatilizáveis em ácido (SVA), granulometria, umidade e teor de matéria orgânica. Em água de fundo, nitrogênio amoniacal e oxigênio dissolvido são parâmetros importantes para acompanhar ensaios ecotoxicológicos. O número de réplicas pode ser definido a partir de dados obtidos na amostragem prévia, utilizando-se fórmulas que se baseiam em valores de variância, desvio ou erro padrão. Mas pode-se optar por se utilizar de 3 a 5 réplicas. Em estudos de sedimento há de se considerar também a variabilidade temporal, já que as variações sazonais podem influenciar a disponibilidade de contaminantes. Para estudos de caracterização e análises de sedimentos, uma única coleta anual no período de seca pode ser suficiente.

Para análise, o sedimento deve ser separado da água por filtração para determinação dos elementos químicos contidos tanto nos sedimentos suspensos como na fração dissolvida. A fração dissolvida é definida como a água e constituintes que passam através de um filtro de membrana com poros de diâmetros de 0,450 μm .

As técnicas mais adequadas para determinação de elementos químicos são: Absorção atômica, ICP – AES (espectrofotometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado) ou ICP-MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado), fluorescência de raios X (alta resolução). A água separada do sedimento pode ser analisada por absorção atômica, cromatografia gasosa ou líquida.

Obtenção e processamento de amostras teciduais para análises laboratoriais

Os animais capturados deverão ser sexados, pesados e medidos. Após a coleta de dados biométricos os indivíduos serão acondicionados em sacos de pano ou em gaiolas e levados ao laboratório onde serão sacrificados. Seguindo os procedimentos recomendados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, os animais serão anestesiados e submetidos à eutanásia. A coleta de material biológico para as análises deverá seguir os cuidados de prevenção de contaminação e deterioração de amostras, citados neste projeto. Os animais que serão utilizados para a avaliação histopatológica e de marcadores do estresse oxidativo terão seu fígado, intestinos e rins retirados durante a necrópsia. Para os girinos o uso dos rins nessas análises dependerá do tamanho dos girinos das espécies selecionadas, considerando a facilidade de dissecação do órgão. Caso a espécie seja muito pequena e conseqüentemente os seus rins, esse órgão não será incluído nas análises.

Para os quelônios, o acesso aos órgãos será feito com a retirada do plastrão, a partir da liberação das junções entre ele e o casco com o auxílio de uma faca, na região da saída dos membros. Para os demais vertebrados à necrópsia, a abertura da cavidade abdominal será feita a partir de uma incisão mediana na linha alba. Em seguida, será feita uma avaliação macroscópica dos órgãos abdominais e torácicos, para identificação de alterações patológicas, presença de parasitas e sinais de contaminação/infecção. Por fim, serão retirados fígado e rins para análises histopatológicas, marcadores de estresse oxidativo e de bioacumulação de metais. Adicionalmente, para girinos será retirado o intestino. A carcaça de todos os animais, bem como amostras de tecido muscular (acondicionadas e devidamente identificadas em criotubos com álcool absoluto) devem depositadas em coleções científicas. As amostras de tecido muscular são uma forma de permitir acesso futuro à informação genética dos espécimes sacrificados.

Após abertura do abdômen, o fígado será dissecado e retirado do animal, utilizando tesoura reta com ponta romba e pinça de dissecação sem dente de rato. O órgão será lavado com solução fisiológica, para retirada do excesso de sangue, pesado e avaliado macroscopicamente quanto ao tamanho, consistência, coloração, congestão, forma das bordas dos lobos, bem como presença de nódulos e parasitas.

A retirada de fragmentos do fígado ($n = 10$ fragmentos/animal) será feita a partir de cortes transversais nos lobos hepáticos, utilizando bisturi ou lâminas de barbear novas e pinça reta sem dente. Estes serão lavados com solução fisiológica antes de serem armazenados, visando a retirada do excesso de sangue oriundo da dissecação. Fragmentos destinados à análise histopatológica ($n = 4$ /animal) devem ter espessura entre 2-3 mm, para propiciar melhor penetração do fixador no tecido. Estes fragmentos serão acondicionados em pote plástico de 50-80 mL (tipo coletores de fezes) contendo solução fixadora de formalina a 10% tamponado (4 fragmentos/pote). O volume de fixador deve ser de 15 a 20 vezes o volume dos fragmentos. Este volume de fixador garantirá uma preservação adequada dos fragmentos. Os potes serão mantidos refrigerados até a chegada no laboratório. No laboratório, esse fixador deverá ser trocado por solução fixadora nova, para manter o poder de fixação da solução fixadora. Outros fragmentos de tecido hepático serão armazenados em criotubos de 5 mL (1 fragmento/ tubo), devidamente identificados, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido por imersão por 5 minutos. Finalmente, os criotubos serão armazenados em freezer a -80 °C até serem processados em laboratório. Enquanto três fragmentos congelados serão destinados à análise de bioacumulação de metais, outros três fragmentos serão usados na avaliação de marcadores de estresse oxidativo (Souza et al. 2018).

Os rins esquerdo e direito serão retirados, pesados e avaliados quanto a tamanho, forma, coloração, consistência e presença de nódulos. Serão realizados cortes longitudinais nos rins esquerdo e direito, utilizando

bisturi ou lâmina de barbear e pinça reta sem dente, para obtenção de fragmentos destinados à histologia (2 fragmentos/animal). O corte longitudinal visa garantir a presença da região cortical e medular nos cortes histológicos que serão analisados microscopicamente. Neste caso, fragmentos de órgãos devem ter espessura entre 2-3 mm, para propiciar melhor penetração do fixador. Os fragmentos serão lavados com solução fisiológica para retirada de excesso de sangue antes de seu armazenamento. Os fragmentos que contenham melhor preservação das regiões cortical e medular juntas serão acondicionados em pote plástico de 50-80 mL (coletores de fezes), devidamente identificados, contendo solução fixadora de formalina a 10% tamponado. O volume do fixador deverá ser de 15 a 20 vezes maior que o volume dos fragmentos. Os potes serão mantidos refrigerados até a chegada no laboratório (Sertorio et al. 2019). No laboratório, esse fixador deverá ser trocado por solução fixadora nova, para manter o poder de fixação da solução fixadora. Outros fragmentos serão armazenados em 4 criotubos de 2 mL (1 fragmento/ tubo), devidamente identificados, e congelados em nitrogênio líquido por imersão por 5 minutos. Posteriormente, os criotubos serão armazenados em freezer a -80 oC até serem processado em laboratório. Dois fragmentos congelados serão destinados à avaliação de marcadores do estresse oxidativo e os outros dois fragmentos serão usados na análise de bioacumulação de metais.

No caso do intestino de girinos este será avaliado macroscopicamente quanto a organização morfológica, coloração e consistência. A presença ou ausência de conteúdo intestinal será feita com o auxílio de um estereomicroscópio (Giroto et al. 2020). Em seguida, o intestino será seccionado transversalmente em fragmentos de 1-2 cm de comprimento, respeitando a separação das regiões do intestino médio e posterior. Os fragmentos serão fixados em solução de formalina 10% tamponada por 24 h (3 fragmentos/pote), devidamente identificados. Depois de fixados, os fragmentos de intestino serão delicadamente lavados com solução fisiológica, utilizando uma seringa de insulina, para retirada do conteúdo intestinal. Os potes contendo os fragmentos de órgãos serão mantidos refrigerados até a chegada no laboratório. Neste local, a solução fixadora deverá ser trocada por soluções novas, para garantir o poder de fixação. Durante todo o processo, o volume do fixador deverá ser de 15 a 20 vezes o volume dos fragmentos (Arauco et al. 2007; Souza et al. 2018; Sertorio et al. 2019). As alças intestinais restantes poderão ser lavadas, para retirada do conteúdo intestinal, armazenadas em criotubo de 5 mL e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido por imersão por 5 minutos. Finalmente, o criotubo será armazenado em ultrafreezer a -80 oC.

Processamento histológico dos fragmentos dos órgãos

Para fragmentos de órgãos de girinos (fígado, rins e intestino), após 24 h de fixação, os fragmentos serão desidratados em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 100%) de 1 h cada, passagem por solução de álcool absoluto: xilol (v/v) por 1 h, diafanização em xilol usado 1 x por 1 h, solução xilol PA novo por 1 h, e imersão em 2 banhos de parafina líquida em estufa a 60oC por 1 h cada. Para as amostras dos demais vertebrados, após 24 h de fixação, os fragmentos serão desidratados em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 100%) de 2h cada, diafanização em xilol PA por 2h e imersão em parafina líquida em estufa a 60oC. Cortes histológicos com 4 µm de espessura serão obtidos utilizando micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) e navalhas de aço de alto perfil 818. Os cortes serão corados com hematoxilina-eosina (H&E) e analisados em microscópio de luz nas objetivas de 10, 20, 40 e 100 x. Nesta análise, serão observados o grau de integridade dos tecidos, bem como a presença de alterações histológicas como degeneração, necrose, desprendimento celular, apoptose e infiltração leucocitária, que podem indicar

toxicidade (Brasileiro Filho 1998; Arauco et al. 2007; Souza et al. 2018; Sertorio et al. 2019).

Avaliação de marcadores do estresse oxidativo

A atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST) serão realizadas utilizando-se 100 mg de cada fragmento de órgão congelado previamente no nitrogênio. Os fragmentos serão homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) e centrifugados a 3500 xg por 10 minutos a 5°C (Souza et al. 2018; Sertorio et al., 2019). O pellet deverá ser congelado para análise das proteínas carboniladas (PC), enquanto o sobrenadante será utilizado nos ensaios de atividade enzimática e determinação de malondialdeído (MDA). A atividade da SOD será avaliada pelo método de pirogalol, baseado na habilidade desta enzima de catalisar a reação do superóxido (O₂) e peróxido de hidrogênio (Dieterich et al. 2000), enquanto que a atividade de CAT será avaliada de acordo com o método de Aebi (1984), pela mensuração da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio. Já a atividade de GST será estimada no espectrofotômetro a 340 nm como descrito por Habig et al. (1974) e calculada pela taxa de oxidação de NADPH. Para as análises de MDA, produto final da peroxidacão lipídica, o sobrenadante será reagido com solução TBARS (15% ácido tricloroacético, 0,375% ácido tiobarbitúrico, 0.25N HCL) por 15 minutos. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico será monitorada a 535 nm como descrito por Buege e Aust (1978). A concentração de PC, produto da oxidação de proteínas, será mensurada bioquimicamente pela adição de 0,5 mL de solução dinitrofenilhidrazina aos pellets de tecido. Os danos às proteínas serão determinados no sobrenadante final, baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em espectrofotometria a 370 nm (Levine et al., 1990). Os níveis de proteína total nos órgãos serão determinados de acordo com Bradford (1976).

Análise de contaminação em insetos e pequenos vertebrados terrestres

As concentrações dos elementos químicos em órgãos e tecidos animais são bons indicadores do fisiológico e condições patológicas dos animais. Os valores normais das concentrações elementares em cada órgão e tecido são necessários conforme dados de referência para experimentos com animais e já são bem estabelecidos e tabelados. Houve uma série de relatórios sobre as concentrações de vários elementos nos órgãos de animais experimentais em condições normais e patológicas. Vários equipamentos podem ser utilizados na detecção de desses elementos químicos e de possíveis contaminantes, como espectrometria de absorção atômica, análise de fluorescência de raios-X, espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) e espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

Cada equipamento tem uma sensibilidade diferente e a escolha depende da quantidade de elemento que se deseja detectar (contaminação alta ou traços). Para detecção de traços, a espectrometria de massa de plasma acoplada indutivamente (ICP-MS) é a técnica mais precisa incluindo amostras biológicas e vegetais. As principais vantagens do ICP-MS sobre os outros métodos são seus limites de detecção mais baixos; velocidade analítica, relativa falta de interferência química e capacidade multi-elementar.

Os animais podem ser coletados vivos ou abatidos. Para girinos, a análise de bioacumulação de metais será feita utilizando o girino inteiro, sem o intestino. Para isso, cada réplica de amostra (ou pool de amostra) será

composta por no mínimo 10 girinos, coletados na mesma unidade amostral (lagoa), garantindo que eles tenham sido expostos às mesmas condições ambientais. Desta forma, será possível obter um pool contendo 1g de matéria úmida, valor necessário para a análise de bioacumulação em ICP-MS. Portanto, após a retirada do intestino, cada pool amostral será armazenado em envelope de papel alumínio devidamente identificado, e imediatamente congelado em nitrogênio líquido por imersão durante 5 minutos. Em seguida, o envelope será armazenado em freezer a -20 °C até o processamento seguinte.

Após coleta do material, os animais inteiros ou os órgãos devem ficar acondicionados em freezer ou container a -70 °C até processamento em laboratório. A liofilização será utilizada para armazenamento das amostras e envio para laboratórios de análise de metais. As amostras biológicas armazenadas em ultra-freezer a -70 °C serão cortadas em pedaços e levadas ao liofilizador, com os criotubos destampados e cobertos com parafilm. Após serem colocados dentro do liofilizador, estes serão secados por 10 a 24 h. As condições de secagem por liofilização serão: pressão 4,2 mm Hg, temperatura de congelamento -70 °C, temperatura do condensador de -40 ± 5 °C e temperatura de trabalho -30 ± 1 °C. Os criotubos contendo os fragmentos liofilizados serão imediatamente fechados com as respectivas tampas ainda no interior do liofilizador, para eliminar a possibilidade de reabsorção de água. Após liofilização, os materiais devem ser secos a 70 °C por 3 h em forno elétrico. Os produtos obtidos serão acondicionados sob refrigeração até envio para o laboratório de análise de metais (laboratório credenciado ou de alta confiabilidade).

As análises devem ser realizadas em triplicata para determinação de erro de medida e comparada com padrões. Para a análise química, 200 microgramas de amostra deve ser pré-digerida em um béquer de Teflon com uma solução ácida de 7,5 ml de HN03 (68%) e 1,0 ml de HF (38%) a 80 °C por 3 h. Em seguida, a amostra em solução ácida deve ser transferida para um vaso de Teflon PFA e aquecida em um digestor de microondas por 2 h a uma pressão de aproximadamente 80 psi. Após o resfriamento, o conteúdo deve sofrer evaporação a cerca de 150°C. Em seguida, deve ser adicionado uma solução de 1,0 ml de HN03 e 0,4 HCl04 (70%) na proporção de 2 para 1 e a solução deve sofrer aquecimento até a secura. Finalmente, o resíduo deve ser dissolvido em 1,0 ml de HN03 (27%) e coloca-se água deionizada até um volume final de 20 ml. As soluções ácidas e a água de diluição devem ser reagentes de grau ICP/MS. As soluções obtidas devem ser filtradas em filtros de membrana de 0,45 µm e mantidas a -10 °C até as medições (absorção atômica, ICP-AES ou ICP-MS).

Para a microscopia eletrônica de varredura as amostras liofilizadas devem ser embutidas em resina especial para microscopia já na forma adequada. Para a microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução as amostras congeladas podem ser cortadas utilizando-se um crio-micrótomo e/ou as amostras liofilizadas devem ser cortadas num micrótomo. As amostras cortadas são colocadas em uma grade de cobre especial para microscopia eletrônica de transmissão.

Especiação química é definida como um processo de identificação e quantificação das diferentes formas ou fases (grau de oxidação e/ou tipo de ligação química) em que um elemento pode estar presente em um material. Se necessário fazer a especiação química dos elementos ela poderá ser realizada através de microscopias de alta resolução com difração de elétrons e sondas EDS e EELS, para medidas locais. Estas medidas podem ser interessantes por utilizar muito pouca quantidade de material.

Prevenção de contaminações, deterioração e perdas de amostras

Os cuidados necessários para a garantia da não contaminação e preservação das amostras biológicas durante sua coleta, armazenamento, envio para o laboratório e análises laboratoriais devem prevenir adulteração das amostras pela contaminação externa, bem como perda das características de interesse. Para isso, antes das coletas de amostras, superfícies de bancadas e equipamentos serão limpos utilizando-se materiais adequados para minimizarem-se perdas de amostras por absorção de elementos-traços nos recipientes laboratoriais. Essa limpeza deve ser feita utilizando-se solução diluída de detergente aniônico, utilizando-se como referência material aprovado pela EPA (2000), escovando-se as superfícies com escova plástica e lavando-as com água destilada. Todos os instrumentos e utensílios não metálicos (baldes, bandejas, grelhas, tábuas de corte) serão descontaminados por meio de lavagem com detergente aniônico e subsequente imersão em solução ácida (5% de ácido clorídrico ultra-puro) por 8 horas e rinsagem com água deionizada (EPA, 2000; Wilde, 2004). Os materiais metálicos serão lavados com solução detergente aniônica e rinsados com água deionizada (EPA, 2000; Wilde, 2004). Quando possível, serão utilizados instrumentos metálicos descartáveis, principalmente os instrumentos de corte (bisturis descartáveis).

As amostras serão obtidas de um animal por vez, utilizando instrumentos, vidrarias e potes devidamente livres de contaminantes. Posteriormente à coleta, serão conduzidos procedimentos de descontaminação e de limpeza de bancadas e instrumentos entre o processamento de cada indivíduo. Todos os recipientes não descartáveis (placas de petri, béquers) serão submetidos a procedimentos apropriados de descontaminação antes de sua reutilização (EPA, 2000; Wilde, 2004). Após a descontaminação, os instrumentos serão acondicionados em sacos plásticos e armazenados em caixas plásticas. As amostras biológicas deverão ser armazenadas de acordo com as condições descritas no presente projeto, que envolve a preservação em solução fixadora de amostras para análises histopatológicas, bem como congelamento em nitrogênio e armazenamento em temperatura de -80°C no caso de amostras para análises de bioacumulação. O acondicionamento dessas amostras será realizado em recipientes não permeáveis antes do congelamento para prevenir o contato das amostras com água de degelo. No processamento de cada amostra, serão utilizadas luvas exclusivas, que serão descartadas ao final de cada procedimento laboratorial.

Eutanásia dos animais: Cuidados éticos e avaliações à necrópsia

Espécimes de pequenos roedores e cães-de-barbicha, destinados à análise de metais e danos teciduais determinados neste projeto, serão eutanasiados seguindo a Resolução 1000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária sobre condutas éticas de eutanásia de animais.

A eutanásia e necrópsia deverá ser realizada por um médico veterinário com experiência na área de patologia veterinária, com o objetivo de: (i) garantir a correta dissecação e retirada dos órgãos selecionados para as análises de acúmulo de metais e análises histológicas e (ii) identificar alterações orgânicas importantes para interpretação de resultados, como presença de ectoparasitas e endoparasitas, deficiências nutricionais que influenciam o escore corporal do animal, alterações patológicas, neoplasias, infecções bacterianas e virais. A indicação do profissional para realização das necrópsias baseia-se no fato de que os animais aqui avaliados são de vida livre, sem controle ou histórico prévio conhecido.

5.1.3. Perguntas e indicadores que buscam entender os efeitos derivados do impacto original nas comunidades de flora e fauna.

Pergunta 4 - Qual o efeito do rompimento da barragem e consequente derramamento de rejeitos que avançaram sobre a vegetação natural, na redução de florestas, na alteração da diversidade (taxonômica, filogenética e funcional), na estrutura e funcionamento das comunidades vegetais remanescentes que receberam rejeito, tendo como base o contexto original da paisagem regional?

Contextualização

A cobertura florestal tem se transformado profundamente nas últimas décadas no Brasil e no mundo (Sloan et al. 2019). De início, vastas extensões de florestas tropicais maduras foram convertidas para usos agropecuários, resultando em um drástico declínio da cobertura florestal em paisagens transformadas pelo homem. No entanto, muitas dessas paisagens têm passado por um processo de transição florestal, resultando numa reversão da tendência histórica de perda de cobertura florestal e dando início a uma fase de ganho de cobertura (Nanni et al. 2019). Como consequência, a cobertura florestal que era antes constituída essencialmente de florestas nativas maduras tem se transformado num mosaico bastante heterogêneo de diferentes tipologias florestais, cada qual exercendo funções ambientais específicas e, consequentemente, diferentes contribuições para a natureza e bem-estar humano. No entanto, pouco se sabe sobre onde estão essas novas florestas e suas diferentes tipologias, como elas provêm diferentes funções ambientais e como essas funções poderiam ser maximizadas para a conservação da natureza como o bem-estar humano (McDowell et al. 2020).

Hipóteses e predições

- A hipótese geral é que nos fragmentos onde o rejeito não eliminou totalmente as florestas, mas adentrou de alguma forma e ficou depositado no chão da floresta, a dinâmica florestal deve estar sendo fortemente alterada, assim como o provimento de serviços ecossistêmicos por esses fragmentos. Essa alteração deve estar ocorrendo em função das alterações abióticas (características de solo e dinâmica da água) e bióticas, como enterramento do banco de sementes, pela eliminação dos regenerantes, e outros, que resultarão na degradação desses fragmentos ao longo do tempo.
- Espera-se que a degradação da comunidade deve se expressar por perda gradual de diversidade, por mudanças na composição e estrutura das comunidades nas áreas impactadas direta ou indiretamente pelo rejeito e por redução no fornecimento de serviços ecossistêmicos, tendo como referência as áreas naturais existentes na região. Portanto, espera-se que hoje, 5 anos após o rompimento, a composição, a estrutura e o fornecimento de serviços ecossistêmicos nas manchas de vegetação onde foi depositado o rejeito seja distinta daquela constatada na porção do fragmento que não sofreu a deposição de rejeito e nas áreas de referência. Espera-se ainda, que com as avaliações periódicas, se confirme que as ações de recuperação definam uma trajetória de sucesso a esses fragmentos impactados, se aproximando às referências.

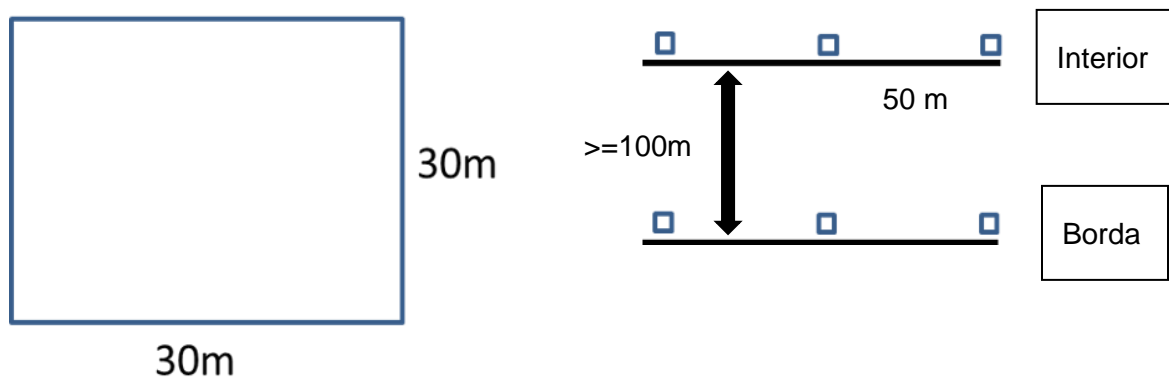
Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura, composição e funcionamento das comunidades vegetais.

Protocolo metodológico

Para avaliar os efeitos da deposição de rejeito na estrutura, funcionamento e provimento de serviços ecossistêmicos em florestas remanescentes do domínio espacial do PG 30, serão avaliados 40 fragmentos de vegetação natural (estágio médio ou avançado), sendo 20 fragmentos em contato com o rio ou a faixa de depósito do rejeito (fragmentos Alvo) e 20 fragmentos sem contato com o rio e fora da faixa de deposição de rejeito (fragmentos Referência). Em cada fragmento serão alocadas 6 parcelas de 30x30m (900m²), distribuídas em dois transectos, um na borda (onde ocorreu deposição de rejeito) e um no interior (fora da deposição de rejeito). O transecto da borda vai descontar os primeiros 10 metros de borda para alocação do transecto. O transecto da borda está distante no mínimo 100 metros do transecto do interior. Em cada transecto serão alocadas 3 parcelas permanentes, de 30x30m cada, distantes no transecto pelo menos 50m uma das outras (Figura 19). As parcelas deverão ser amostradas com periodicidade anual durante 5 anos.

Figura 19: Desenho amostral dos transectos com 3 parcelas permanentes cada de 30x30m, distantes 50m no transecto. O transecto na borda representa o limite entre a deposição de rejeito e a vegetação remanescente sem deposição de rejeito. O interior é a porção do fragmento sem deposição de rejeito.



Para cada parcela, instalar uma estaca de cano de PVC em cada quina da parcela, utilizando a técnica de controle de ângulo e distâncias a partir dos valores de Azimute da bússola e trena (coletar o Azimute de um dos lados da parcela). As estacas devem ser fincadas firmemente ao solo com a ajuda da marreta, e quando necessário também com a escavadeira. Em cada avaliação em campo das parcelas, o limite lateral da parcela deve ser delimitado com uso de barbante amarrado às estacas, para facilitar a definição das árvores que estão dentro e fora da parcela. O barbante deve ser retirado ao fim das coletas na parcela (sugestão: no caso de APP, fazer a primeira lateral paralela e beirando o rio). Para cada avaliação as planilhas de campo devem ser digitalizadas através de fotos com a câmera fotográfica e isso deverá ser armazenado em um banco de dados construído especificamente para esse programa.

Para amostrar cada parcela nos Fragmentos Florestais Remanescentes, propõe-se a metodologia de avaliação dos benefícios ambientais e do provimento de serviços ecossistêmicos de Brancalion & Rodrigues 2019, onde em cada parcela de 30x30m serão amostrados os seguintes indicadores de diversidade, de composição, de estrutura e de provimento de serviços ecossistêmicos.

Diversidade, composição e estrutura das comunidades vegetais – Inventário florestal

No inventário florestal serão plaqueados, mensurados e identificados todos os indivíduos de arbustos, árvores, palmeiras ou samambaia-açu com pelo menos um fuste com diâmetro à altura do peito - DAP \geq 5 cm. O DAP será mensurado com fita diamétrica. As placas devem ser colocadas nas árvores sempre voltadas para o mesmo sentido (ex: voltadas para o norte), para facilitar o controle de campo e garantir que nenhum indivíduo deixe de ser mensurado ou seja mensurado mais de uma vez. Todos os fustes com DAP \geq 5 cm de um mesmo indivíduo deverão ser mensurados e seus valores informados na planilha de campo.

A dominância das copas de árvores de cada arbusto, árvores, palmeiras ou samambaia-açu será classificada em uma das seguintes classes: 1) suprimida (S): árvores cujas copas estão abaixo do nível geral do dossel e não recebem luz direta. As copas são geralmente curtas, esparsas e estreitas; 2) intermediária (I): árvores cujas copas ocupam uma posição subordinada no dossel. Eles recebem alguma luz direta de cima, mas nenhuma luz direta dos lados. As copas são geralmente estreitas e / ou unilaterais, e mais curtas que as árvores dominantes e codominantes. 3) co-dominante (C): árvores cujas copas compõem o nível geral do dossel. Eles recebem luz direta de cima, mas pouca ou nenhuma luz dos lados. Geralmente são menores que as árvores dominantes.; 4) dominante (D): Árvores cujas coroas se estendem acima do nível geral do dossel. Eles recebem luz total de cima e alguma luz dos lados. Geralmente, eles têm as maiores e mais completas coroas do estande.

Devem ser mensurados também os indivíduos mortos em pé com DAP \geq 5 cm (i.e. árvores sem folhas e com câmbio abaixo da casca morto, o que pode ser observado pela raspagem da casca da árvore com facão e observação se a parte interna da casca apresenta coloração verde). Deve-se registrar o DAP da árvore (quando a árvore não tiver altura de 1,30 m, medir a circunferência à altura do peito - CAP a 0,30 m do solo) e classificá-la quanto ao seu grau de decomposição (GD), mas sem a necessidade de plaqueamento ou identificação:

- GD1: Árvore morta (sem folha e floema aparentemente seco), em que o processo de decomposição ainda não é evidente,
- GD2: Árvore com sinais iniciais de decomposição, com casca já “desmanchando” e galhos se soltando com facilidade,
- GD3: Árvore em que o processo de decomposição já se encontra em estágio avançado, com casca e tronco se desfazendo ao toque,
- GD4: Árvore em fase final de decomposição, em que todo o tronco cai no chão ou se desfaz com um leve toque

Deve-se coletar o material botânico, conforme descrição abaixo, de um indivíduo de cada espécie presente na parcela. Ou seja, mesmo que uma determinada espécie já tenha sido coletada na parcela vizinha, novamente deverá ser coletado um ramo para identificação botânica no caso dessa mesma espécie voltar a ser encontrada numa outra parcela da mesma área. Deve-se indicar na planilha de qual indivíduo do inventário foi realizada a coleta do material botânico, para que, a partir do número da placa de identificação do indivíduo, possa-se retornar ao mesmo para a coleta de um outro material botânico. É necessário indicar na planilha quando mais de um indivíduo pertence à mesma espécie.

A coleta do material botânico consiste na coleta de ramos (de preferência com material reprodutivo – flores e/ou frutos) para confecção da exsicata, contendo pelo menos algumas folhas completas e bem desenvolvidas (atentar para não coletar somente uma folha composta). Quando o indivíduo não apresentar flores e/ou frutos, coletar apenas 1 ramo, mesmo que tenha conhecimento da espécie (lembrando da regra: coletar uma amostra

de cada espécie da parcela). Quando o indivíduo apresentar flores e/ou frutos, coletar de 3-5 ramos do mesmo indivíduo. Na impossibilidade de coleta dos ramos, deve-se retirar um pedaço da casca do indivíduo, incluindo a parte interna da casca. O número da placa metálica fixada no indivíduo deverá ser anotado em um pedaço de fita crepe e este deverá ser fixado na base do ramo. Na coluna “características” da planilha de campo, deverão ser informadas características adicionais da espécie que facilitem sua identificação (ex: “presença de látex”, “cheiro da folha” e “cor da flor”). O material botânico coletado em campo deve ser preparado no mesmo dia, como detalhado no tópico 5.

Os indivíduos com DAP < 5 cm mas com altura \geq 2 m deverão ser contados, mas não deverão ser plaqueados, identificados ou ter o DAP medido. Indivíduos regenerantes com altura entre 50 e 200 cm deverão ser contados em uma sub-parcela de 4 m x 25 m (Figura 1). Em monoculturas abandonadas ou em uso, consórcios de poucas espécies, e maciços de invasoras, deverá ser medida a altura de 15 indivíduos com DAP \geq 5 cm, sendo 5 grandes, 5 médios e 5 pequenos, a serem definidos em função da distribuição diamétrica do plantio, com o uso de um hipsômetro digital Vertex. Esses dados serão posteriormente utilizados para a formulação de uma equação alométrica (Altura \sim CAP). O grau de infestação por lianas ou gramíneas na parcela será classificado como 0; 0% – 25%; 25% – 50%; 50% – 75%; e 75% – 100%.

Para cada material botânico coletado, será criado um código de identificação único do coletor (ex.: “AP100”, onde “AP” corresponde às iniciais de nome e sobrenome do coletor e o “100” ao número de coleta do respectivo coletor). Deve-se anotar na planilha de inventário o código que cada coleta recebeu. Deverá ser montada uma exsicata com cada material botânico. Para a confecção das exsicatas, os ramos devem ser colocados entre folhas de jornal (jornal-folha-jornal) com o código de identificação do ramo escrito à lápis dermatográfico no jornal. As unidades jornal-ramo-jornal devem ser empilhadas e prensadas entre duas folhas de papelão. Depois de prensadas, as exsicatas deverão ser secas em estufa (70°C por 72h), quando houver uma estufa disponível no local de coleta. Na ausência de uma estufa (situação dominante nas áreas de estudo), as exsicatas já prensadas deverão ser conservadas em álcool. Para isso, o pacote de exsicatas prensadas será inserido em um saco plástico grande, transparente e resistente, e posteriormente embebido com o álcool (ideal: concentração 92% – não usar álcool com concentração menor que 70%). Embora o armazenamento em álcool possa conservar os ramos por meses, deve-se realizar verificações periódicas para garantir que o interior do saco plástico fique sempre úmido com álcool. Todas as exsicatas, e respectivas duplicatas deverão ser incorporados em pelos menos 2 herbários cadastrados existentes dentro da bacia do rio Doce.

Funções ecossistêmicas

Madeira morta caída

A madeira morta caída (i.e. troncos e galhos) será quantificada pelo método de interceptação, utilizando-se duas linhas de 30 m cada instaladas em duas bordas opostas da parcela (Figura 20). Toda madeira morta caída com diâmetro \geq 10 cm que intercepte essa linha terá seu diâmetro medido, enquanto galhos com diâmetro < 10 cm serão contados em secções equivalentes a 20% da linha (6 m do comprimento total). A madeira morta caída será classificada pelo grau de decomposição (GD):

- GD1: Madeira sólida com folhas ou pequenos galhos presos
- GD2: Madeira sólida com casca intacta, mas sem folhas ou galhos

- GD3: Madeira sólida, com a casca se desfazendo
- GD4: Madeira podre, frágil, que pode ser quebrada se chutada
- GD5: Madeira podre, frágil, que pode ser facilmente quebrada

Serapilheira

Serão coletadas amostras da serapilheira depositada sobre o solo, considerando-se como serapilheira todo o material vegetal (e.g. folhas, galhos, cascas, frutos, flores), sem distinção do tipo de planta a que o material pertence (e.g. gramíneas, árvores, samambaias), disponível sobre a superfície, incluindo-se materiais em qualquer nível de decomposição (e.g. de folhas verdes a folha já muito decompostas). A serapilheira deverá ser coletada em três pontos por parcela, ao longo de sua diagonal, sendo um ponto de coleta no centro e dois próximos às extremidades da diagonal. Essa coleta será realizada com quadrados amostrais (dimensionados com trena ou confeccionados com madeira) com dimensões de 25 x 25 cm, nos quais a serapilheira deverá ser cuidadosamente removida, tomando-se o cuidado para não desestruturar o solo embaixo da serapilheira (evitar puxar raízes e galhos que possam estar presos ao solo; Figura 20).

As amostras de serapilheira serão acondicionadas em sacos de papel, nos quais deverá ser anotada a identificação da amostra. Os sacos de papel contendo a serapilheira serão secos em estufa de circulação forçada a ~40°C por no mínimo 2 dias, até obter o peso seco constante. O material já seco será então removido do saco de papel e pesado em balança de precisão, devendo-se informar os resultados em gramas.

Solos

Amostras de solo serão coletadas nos mesmos pontos de amostragem de serapilheira, logo após a coleta desse material. Utilizando um trado, serão obtidas duas amostras nas profundidades de 0-10 cm e de 10-20 cm em cada um dos três pontos, gerando uma amostra composta de cada profundidade, que serão acondicionadas em sacos plásticos, onde será anotada a identificação da amostra, com duas respectivas profundidades. Serão coletadas em seguida uma amostra indeformada de solo em cada ponto. Utilizando um amostrador de solo, serão obtidas amostras com anel volumétrico de volume conhecido na profundidade de 0-10 cm. Será feito o tolete e essas amostras serão acondicionadas em um único saco plástico, que será identificado. No ponto central, mais uma amostra de solo indeformado será coletada. O anel já contendo a amostra indeformada de solo deverá ser embalado em plástico filme e identificado.

Para as análises química e de matéria orgânica do solo serão utilizadas as amostras deformadas de solo, coletadas em cada parcela. O protocolo para avaliação dos metais contaminantes no solo segue o descrito na Pergunta 1. Deverá ser coletada uma amostra composta resultante de nove pontos de amostragem. Essa análise deverá ser realizada em laboratório credenciado ou de referência. Os passos para a análise são:

- a) cada amostra de solo coletada em campo, é transferida do saquinho de coleta para uma bandeja de alumínio, devidamente identificada com as informações da amostra (parcela, ponto de coleta da parcela, mês e ano de coleta), e levada para a estufa à 40 °C, na qual permanecerá por 3 dias.

- b) Após completados os dias em estufa, as amostras são retiradas uma a uma para a próxima etapa de processamento. A amostra, agora seca em estufa, é macerada, peneirada em peneira de 2 mesh e transferida uma pequena proporção para um frasco de acrílico, no qual será realizada uma posterior etapa de peneiração, em peneira de 0,5mm, assim estando pronta para a quantificação de carbono e nitrogênio presentes na amostra.
- c) O restante da amostra de solo já peneirada é devolvido nos saquinhos originais e encaminhada para o laboratório responsável pelas demais análises.
- d) Para a análise de carbono e nitrogênio é utilizado o equipamento “Leco Truspec Micro”, no qual a amostra é queimada em alta temperatura (1050°C) com oxigênio ultra puro, sendo o carbono convertido em CO², e esse CO² é lido pela célula de infravermelho, já o nitrogênio é lido por condutividade térmica.

Para as análises físicas do solo um conjunto de procedimentos deverá ser realizado. A condutividade hidráulica tem como objetivo identificar a relação entre a carga e a velocidade que a água pode se movimentar por uma amostra de solo. Para essa análise são utilizadas as amostras indeformadas de solo, coletadas em cada parcela. Considerando duas amostras por parcela, com anéis metálicos de aproximadamente 88cm³. Essa análise é realizada em laboratórios de análises físicas credenciados e com certificação de qualidade. Os passos para a análise são:

- a) Em cada um dos anéis metálicos de amostras indeformadas é colocado na extremidade inferior uma membrana de tecido do tipo morim, fixada por um elástico de borracha. Observação: a membrana e o elástico de borracha respectivos de cada amostra devem ser pesados anteriormente de serem fixados ao anel, em balança de precisão para que não seja considerado o peso desses componentes nos cálculos das etapas de análise física.
- b) Um lote de anéis metálico preparados, como indicado acima, deve ser reservado em um recipiente plano contendo água até que o solo contido nos anéis atinja a saturação.
- c) Em seguida, colocar na parte superior de cada anel metálico, um outro anel, com o mesmo diâmetro e espessura, sendo fixado com auxílio de fita adesiva impermeável. É importante manter a identificação das amostras a vista para que não ocorram confusões.
- d) Com as amostras saturadas e fixas com dois anéis (um acima do outro), é inserida, pela extremidade superior, uma camada de lã de vidro em sua superfície de solo, para que a mesma não sofra alterações em suas estruturas físicas com a percolação da água, na etapa a seguir.
- e) As amostras são posicionadas nos suportes e seus volumes completados com água deionizada. São inseridas mangueirinhas dentro de cada amostra de forma que ela a abastecerá com água, conforme a infiltração ocorre. Estas mangueiras fazem parte do equipamento (permeâmetro), composto por um ou dois cilindros de vidro com água deionizada que devem estar posicionados nivelados com o tubo do reservatório, de modo que a parte inferior fique em nível com a parte superior do anel, para manter a carga hidráulica de 2 cm de altura.
- f) Abaixo de cada um dos suportes é colocado uma proveta para captar o volume de água percolado pelo solo durante a análise.

- g) Medir com proveta o volume percolado a cada dez minutos de percolação de água, durante um total de 120 minutos. Continuar as avaliações após este período se o coeficiente de variação das três últimas amostras for maior que 20%.
- h) Anotar o volume percolado. A medida quantitativa da condutividade hidráulica é obtida por meio da aplicação da equação de Darcy após um período de avaliação de uma a duas horas; caso ainda ocorra variações, continuar as avaliações até quando os valores forem constantes.

Para a avaliação da retenção de água (Panela de Richards), as amostras de solos são dispostas em um meio poroso (placa de cerâmica) e dessaturadas até o equilíbrio com um potencial aplicado por pressurização. Para manter a pressurização, as amostras são mantidas em câmaras herméticas, sobre placas porosas de cerâmica, previamente saturadas com água desaerada, providas de um sistema de drenagem, sendo a pressurização fornecida por um sistema com compressores, reguladores de pressão e manômetros. O potencial (pressão) desejado é ajustado e, conseqüentemente, a água retida com forças menores que o potencial aplicado move-se em direção e através da placa cerâmica, passando para o sistema de drenagem. O equilíbrio é determinado quando a drenagem do efluxo cessa e o conteúdo de água é estimado gravimetricamente por pesagem. Os passos para a análise são:

- a) Finalizado o processo de condutividade hidráulica, retira-se a fita e o anel superior de cada amostra para então saturá-las novamente. Attingindo o ponto de saturação deve-se pesar as amostras saturadas (com a membrana e elásticos presos ainda) e anotar os valores obtidos.
- b) Posiciona-se então as amostras dentro da panela de Richards, acomodando-as acima de uma placa porosa de cerâmica que auxilia no escoamento da água que sairá de dentro da amostra.
- c) Fecha-se a panela e o equipamento deverá ser calibrado em uma pressão de XX kpa, de forma que esta pressão forçará a água dos micro e macroporos (maior volume de retenção de água do solo) para fora das amostras.
- d) O equipamento eliminará a água excedente conforme o tempo, este processo pode levar alguns dias dependendo das condições físicas do solo. Após verificar a ausência da saída de água das amostras, elas poderão ser retiradas da panela e pesadas novamente.
- e) Com as amostras pesadas, as mesmas são levadas para a estufa em uma temperatura de 105 °C por 12 horas, de forma a retirar toda a reserva hídrica dentro dela (água contida nos microporos). Então pesa-se novamente as amostras.

Os solos serão também analisados com um penetrômetro, equipamento empregado para determinação da consistência de uma amostra indeformada de solo em condições predefinidas de carga, tempo e temperatura. A penetração é feita por agulha padrão na posição vertical. Possui controle magnético e temporizador digital que libera automaticamente o êmbolo e assegura a queda livre da agulha durante o ensaio de 5 segundos.

A análise de granulometria deverá ser realizada com a porção de solo deformado, e consiste na separação das frações do solo em silte, areia e argila. Os passos para a análise são:

- a) Primeiramente das amostras de solos deformadas - e que anteriormente já passaram pela peneira de dois mesh - são geradas duas subamostras, uma delas contendo 40g para análises de granulometria, e a outra com 10g para cálculo do teor de umidade do

solo, que são pesada no próprio laboratório de análises físicas, com auxílio uma balança analítica, e cada uma delas será depositada em um pequeno béquer.

b) A subamostra de 40g é misturada em água deionizada e um líquido ácido e permanece em um agitador por 12h, em recipientes de vidro com tampa e capacidade de 200mL.

c) A seguir, anexar um funil com uma peneira com malha de 0,053mm, e colocar este conjunto sobre um cilindro de sedimentação. Despejar na peneira o conteúdo do recipiente de vidro, o qual a subamostra estava no agitador. Para garantir que todo o conteúdo seja transferido, deve-se lavar sobre a peneira o recipiente e a tampa com água deionizada. Essa etapa garante que o silte e a argila passem pela peneira e a fração areia permaneça na peneira. A fração areia deverá ser transferida para recipiente próprio disponível no próprio laboratório.

d) O recipiente com a fração areia deve ser encaminhado para estufa a 105°C, por 24 horas.

e) Após essa etapa, deve-se retirar a amostra seca da estufa, e deixar esfriar e pesar em balança analítica.

f) A fração silte e argila ficaram em cilindros de vidro de sedimentação de solo com capacidade para 1L, no qual são bem misturados e reservados para permanecerem em decantação.

Infiltração de água no solo

A infiltração será coletada em um ponto por parcela, alocada preferencialmente em seu centro, quando atender aos requisitos do método BEST (Beerkan Estimation of Soil Transfer), descrito abaixo (procedimento completo disponível em: https://www.youtube.com/watch?time_continue=16&v=vDrpUBuwwvY):

- Passo 1 - Alocação do ponto: deve-se selecionar uma superfície o mais plana possível para a alocação do ponto, evitando locais que são visualmente passagem de fluxos acumulados em eventos de chuva ou trilhas de gado (Figura 20);
- Passo 2 - Limpeza da área: todo o material acima da superfície do solo (serapilheira) deve ser retirado com cuidado para não desestruturar o solo, sem puxar galhos e raízes. A vegetação rasteira e herbácea (e.g. gramíneas, culturas agrícolas, vegetação nativa do sub-bosque) deve ser cortada rente ao solo com o auxílio de uma tesoura de poda;
- Passo 3 - Inserção do anel: O anel deve ser inserido no solo cerca de 1 cm abaixo da superfície (ou até que não seja permitido o vazamento de água nas laterais) com o auxílio da marreta de borracha, tomando-se o cuidado do anel não quicar no solo ao bater com a marreta.
- Passo 4 - Checagem: Antes de começar o teste, verificar se a planilha de anotação e o cronômetro estão em mãos. Encher os copos com 150 ml de água ou 75 ml (para a pastagens ou casos excepcionais de solo compactado);
- Passo 5 - Avaliação: Iniciar o cronômetro junto com o derramamento do primeiro copo de água. Quando virar o copo com água, deixar os dedos na borda do copo, formando uma “peneira”, para diminuir o impacto da água no solo. O segundo copo deve ser virado imediatamente após o primeiro infiltrar totalmente no solo. Isso pode ser observado pelo brilho da superfície ou pequenas

poças de água que se formam na microrrugosidade do solo. O terceiro copo deve ser virado quando o segundo infiltrar completamente, e assim sucessivamente. O tempo no cronômetro deve ser marcado de forma acumulativa a cada copo virado. Esse procedimento deve ser repetido no mínimo 8 vezes e recomenda-se parar até que o tempo entre um copo e outro esteja estável, o que geralmente ocorre entre o 10° e o 15° copo.

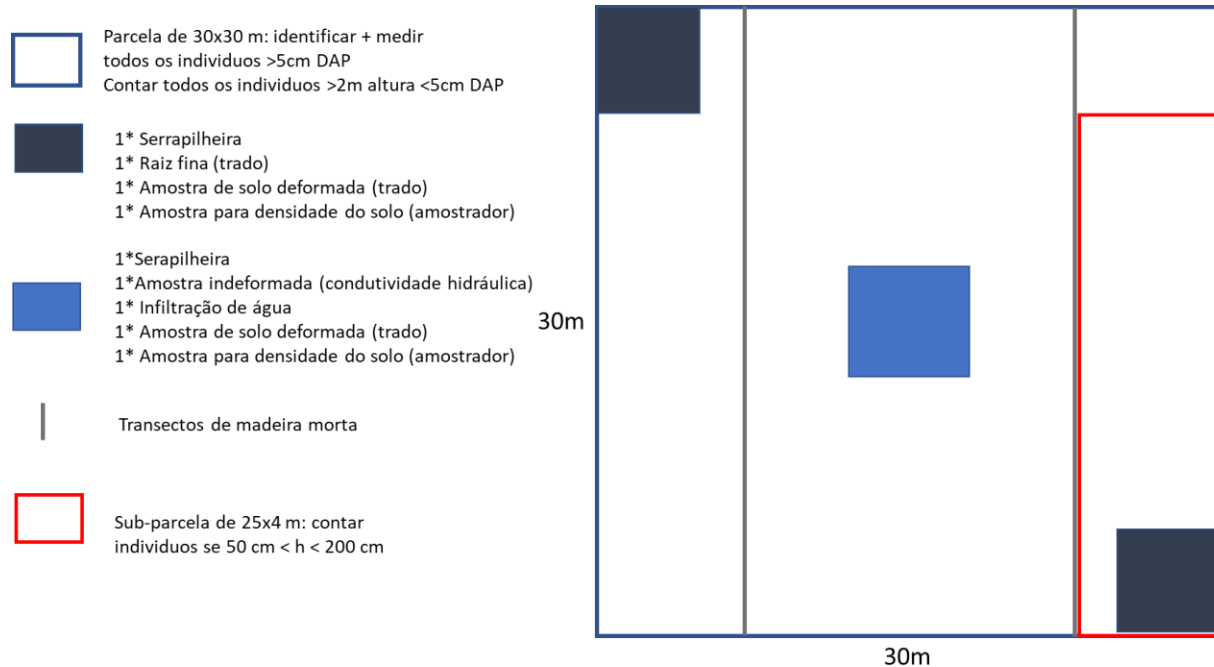
Raiz fina

A coleta de raiz fina será realizada em dois pontos da parcela, preferencialmente próximo aos dois pontos de coleta de amostras indeformadas de solo. Em cada ponto, será coletada com trado uma amostra de solo deformada na profundidade de 0-10 cm, a qual será acondicionada em saco plástico, no qual deverá ser anotada a identificação da amostra.

As raízes finas serão coletadas através do método ponto-a-ponto, que consiste em remover todas as raízes com diâmetro ≤ 2 mm em 4 intervalos de tempo de 2 minutos, as quais serão então colocadas em sacos de papel, nos quais o intervalo da coleta (I, II, III, e IV) será anotado. Depois de separadas do solo, as raízes devem ser lavadas, secas em estufa de circulação forçada a $\sim 40^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 2 dias, até obter o peso seco constante, e pesadas em balança de precisão, mantendo-se a separação das amostras obtidas por intervalo de coleta e anotando-se os valores de forma independente. Caso as raízes não possam ser processadas após a separação, deverão ser armazenadas em freezer.

O esquema abaixo (Figura 20) ilustra as diferentes amostragens e a disposição espacial das sub-parcelas em cada uma das parcelas de 30x30 nos 40 fragmentos florestais.

Figura 20: Esquema da parcela amostral de 30x30m a ser alocada em **transectos nos fragmentos florestais remanescentes em estágio médio e avançado de regeneração**, com as subparcelas de 25x4m, as de 3x3m e os pontos de amostragem de diferentes indicadores (serapilheira, solo, infiltração de água no solo, madeira morta e raízes finas). Modificado de Brancalion & Rodrigues (2019).



Pergunta 5 - Qual a magnitude espaço-temporal dos impactos crônicos (persistentes ou recorrentes) da presença da mancha de rejeitos sobre a diversidade e características de insetos terrestres?

Contextualização

Insetos são considerados bons bioindicadores no ambiente terrestre e aquático e conectam esses sistemas, muitas vezes, através das matas ciliares que ocorrem ao longo dos rios ou lagos, e que servem de habitat para nidificação, refúgio e forrageamento para esses organismos. Nesses habitats de vegetação circundante aos corpos d'água, tais grupos são também importantes pois fazem a ligação entre outros níveis tróficos, como plantas e vertebrados predadores, sendo responsáveis por diversos serviços ecossistêmicos (Crespo-Pérez et al. 2020; Prather et al. 2013). Alterações na estrutura do habitat ou na paisagem que causem mudanças na disponibilidade ou qualidade de recursos devido a atividades humanas podem ter efeitos em toda a cadeia trófica (Chase et al. 2020), e podem ser verificadas a partir de mudanças na estrutura de populações, comunidades ou na escala de ecossistemas (Pinek et al. 2020). Esses efeitos em cascata podem ser ampliados, alterando o fluxo de matéria e de energia nos ecossistemas aquáticos e terrestres.

Alguns grupos de insetos destacam-se como indicadores de qualidade ambiental por serem especialistas em recursos, apresentarem alta fidelidade ao habitat e ciclo de vida curto (Freitas et al. 2006; Uehara-Prado & Ribeiro 2012). Dessa forma, para responder às perguntas dos efeitos remanescentes da presença da mancha

de rejeitos sobre a diversidade de insetos terrestres sugere-se a avaliação dos seguintes grupos taxonômicos: abelhas, besouros escarabeíneos, borboletas frugívoras, formigas e libélulas. Assim, pretende-se entender os efeitos crônicos remanescentes da presença da mancha de rejeitos sobre a diversidade, qualidade nutricional e controle do desenvolvimento de insetos.

Os cinco grupos de insetos selecionados são muito comuns em sistemas terrestres ou próximos de corpos d'água, como as libélulas, e são sensíveis à mudanças e impactos naturais ou antrópicos, bem como a efeitos de regeneração ou sucessão secundária sendo por isso utilizados como bioindicadores de qualidade do habitat (Brown Jr. & Freitas 2000; Nichols et al. 2007; Siddig et al. 2016; Tibcherani et al. 2018). Além de serem comuns, são insetos facilmente amostrados e que possuem boa resolução taxonômica, contando com expressiva gama de especialistas nas instituições de pesquisa do Sudeste brasileiro. Os cinco taxa apresentam diferentes histórias de vida e capacidade de dispersão ao longo da paisagem, sendo alguns grupos sociais, outros solitários, pertencem a distintas guildas alimentares, herbívoros, predadores e detritívoros, e são responsáveis por diversos serviços ecossistêmicos, como polinização, dispersão secundária de sementes, o controle de pragas e a ciclagem de nutrientes (Folgarait 1998; Andresen 2002; Davis et al. 2002; Nichols et al. 2008; Nunes et al. 2018). Em seguida, são detalhadas as características de cada um dos grupos.

As abelhas (Hymenoptera) desempenham importante papel na cadeia alimentar global, consideradas como os polinizadores mais importantes para culturas humanas (Klein et al. 2007; Novais et al. 2016), além de outros serviços ecossistêmicos como produção de fármacos, produção de alimento e dispersão de sementes (Elizalde et al. 2020). Esses insetos utilizam os recursos florais para a alimentação e algumas espécies utilizam a vegetação ou o solo para a nidificação e, como respondem aos efeitos da composição de espécies de plantas (Alvarenga et al. 2020; Sydenham et al. 2016; Wu et al. 2018) são sensíveis às mudanças no habitat, como o desmatamento, a poluição e acúmulo de metais pesados nas plantas, especialmente no pólen. A presença de abelhas nos ecossistemas indica qualidade ambiental, enquanto a sua redução ameaça a saúde ambiental dos ecossistemas existentes através da perda do serviço ecossistêmico da polinização, tanto de plantas em ambientes naturais quanto em cultivos agrícolas, colocando em risco a segurança alimentar (Novais et al. 2016). Impactos ambientais que promovam alterações na biodiversidade e na distribuição desses organismos têm o potencial de afetar diretamente a economia, a população e os ecossistemas em torno de áreas afetadas.

Os besouros escarabeíneos são popularmente conhecidos como besouros “rola-bosta”, pertencentes à subfamília Scarabaeinae (Família Scarabaeidae). Estes insetos se alimentam de líquidos ricos em microorganismos encontrados em fezes de mamíferos ou carcaças (Halffter & Edmonds 1982). Estes besouros escarabeíneos constituem um componente importante na maioria dos ecossistemas terrestres (Hanski 1991) e seu comportamento cumpre importantes serviços ambientais (Braga et al. 2013; Nichols et al. 2008; Nunes et al. 2018). Esses insetos nidificam no solo ou abaixo de fezes de vertebrados e, dentre as características que destacam o uso de besouros como indicadores biológicos, pode-se citar: grande riqueza e ampla distribuição geográfica, a representação em quase todos os grupos tróficos e a especialização no uso de recursos, como fezes ou carcaças.

As borboletas frugívoras (Lepidoptera, Nymphalidae) são amplamente distribuídas em sistemas tropicais, onde as formas imaturas são normalmente herbívoras e se alimentam de frutas podres, de material em decomposição (como fezes e carniça de mamíferos) e de seiva de plantas (DeVries 1988; Freitas et al. 2014). Esses insetos são especialistas de recursos específicos, possuindo fidelidade a microhabitats, e sensíveis a mudanças sazonais e da estrutura do habitat (Oostermeijer & Van Swaay 1998; Freitas et al. 2003), sendo, portanto,

considerados como bons bioindicadores de qualidade de habitat (Uehara-Prado et al. 2010; DeVictor et al. 2012), uma vez que respondem diretamente às características da vegetação e matriz circundante, além de serem facilmente amostradas (Freitas et al. 2006; Oostermeijer e Van Swaay, 1998; Siddig et al. 2016).

As formigas (Formicidae) representam um táxon extremamente diverso e amplamente distribuído (Hölldobler & Wilson, 2009; Moreau & Bell 2013). Esses insetos sociais utilizam diversos tipos de recursos para alimentação, sendo algumas espécies predadoras, outras detritívoras e utilizam de recursos vegetais como nectários extra-florais, arilos encontrados em sementes ou são cultivadoras de fungos. Formigas também podem nidificar nas árvores, na serapilheira ou mesmo em camadas mais profundas do solo. Pelas suas características comportamentais são associados a distintas funções ecossistêmicas, como controle de pragas, dispersão secundária de sementes, ciclagem de nutrientes, decomposição e bioturbação do solo (Elizalde et al. 2020). Devido à forma de uso do habitat as formigas são sensíveis a mudanças ambientais ou a distúrbios antrópicos (Philpott et al. 2010; Andersen 2019), sendo consideradas como um bom bioindicador de qualidade de habitats terrestres (Ribas et al. 2012).

As libélulas (Odonata, Zygoptera e Anisoptera) são reconhecidas pelo seu papel ecológico tanto no ambiente aquático quanto no terrestre, uma vez que são predadores em ambos os habitats durante as fases larval e adulta (Remsburg & Turner 2009; Samways & Sharratt 2010). Estudos anteriores mostraram que os odonatas são sensíveis à alteração de habitat (Harabis & Dolny 2015), à presença de plantas exóticas na vegetação ripária (Samways & Sharratt 2010) e à qualidade da água (Kietzka et al. 2017), sendo que apresentam respostas rápidas a presença de distúrbios ambientais (Sahlén & Ekestubbe 2001). Muitas espécies possuem distribuição restrita devido a demandas ecofisiológicas inerentes (Nessimian et al. 2008), sendo assim considerados bons bioindicadores de ecossistemas terrestres e aquáticos (Siddig et al. 2016).

Além da presença de espécies e estrutura das comunidades de insetos, outros indicadores que podem ser úteis para o monitoramento da qualidade de um habitat são medidas de qualidade nutricional e de desenvolvimento dos indivíduos, como a assimetria flutuante (AF) e a morfometria. Dessa forma, por meio de ferramentas que avaliam a condição da saúde de indivíduos de insetos, é possível saber como as espécies de insetos respondem às mudanças ambientais usando as medidas ecofisiológicas (Simpson et al. 2015). A qualidade da dieta de um animal depende da ingestão ideal de proteína, carboidrato e da proporção lipídica que maximiza a sobrevivência individual e o sucesso reprodutivo (Simpson et al. 2015). Os indicadores da condição fisiológica e morfológica podem descrever como está a saúde do inseto e, portanto, a qualidade do habitat onde ele se desenvolveu (Cooke et al. 2013). Utilizando essas ferramentas pode-se ter informações sobre o estado de saúde de indivíduos ou populações presentes em áreas em distintas situações de pressões antrópicas ou mesmo condições de estresse (Salomão et al. 2018; González-Tokman et al. 2020).

A avaliação da qualidade nutricional dos insetos terrestres pode ser feita por diversas medidas que refletem a conversão de recursos em biomassa, o acúmulo de recursos em reservas de lipídeos e a razão entre músculos torácicos e tamanho corporal (Peixoto & Benson 2011). Assim, variações na qualidade nutricional de insetos podem refletir investimentos diferenciais de recursos que permitem avaliar a saúde de espécies que se desenvolvem em áreas sob diferentes graus de impacto, como áreas com a presença da mancha de rejeitos.

A assimetria flutuante (AF) representa pequenas variações aleatórias na simetria de caracteres bilaterais e tem sido um parâmetro amplamente usado como medida de instabilidade de desenvolvimento em plantas e animais (Beasley et al. 2013). Organismos que se desenvolvem em ambientes de menor estresse ambiental são

capazes de corrigir erros aleatórios no desenvolvimento (Kozlov et al. 2017) e, assim, não são produzidos desvios do eixo de simetria bilateral. Com o aumento das pressões antrópicas ou do estresse ambiental, aumenta a probabilidade de instabilidades ou erros de desenvolvimento, que podem ser mensurados como desvios da simetria (Beasley et al. 2013). Dessa forma, a AF representa uma ferramenta eficiente para o monitoramento da saúde de plantas e animais sob pressões antrópicas ou mesmo estresse ambiental (Beasley et al. 2013; Alves-Silva et al. 2018; Henriques & Cornelissen 2020).

Além das características citadas acima, para que um indicador cumpra seu objetivo de utilização em um programa de monitoramento, sua escolha deve ser baseada em premissas e critérios bem estabelecidos pelo Relatório de Definição dos Indicadores de Biodiversidade, elaborado pelo Instituto Ekos Brasil (2020). Sendo assim, considera-se que os taxa selecionados contemplam pelo menos 8 dos 10 critérios sugeridos no relatório do Instituto Ekos Brasil (2020).

Hipóteses e predições

Na escala de comunidades:

- A hipótese geral é que haverá alteração na estrutura e composição das comunidades de insetos nos fragmentos florestais das áreas diretamente ou indiretamente afetadas pela presença do rejeito;
- Espera-se encontrar menor riqueza de espécies em áreas com a presença de manchas de rejeitos se comparadas a áreas de influência indireta ou de referência, e que esse efeito negativo diminua com o passar dos anos;
- Espera-se que a composição de espécies de insetos terrestres nas áreas de vegetação presentes próximas das áreas de rejeitos seja distinta da composição de espécies encontrada nas áreas de referência, mas que essa dissimilaridade (Beta diversidade espacial) diminua com o passar dos anos;
- Espera-se que a variação temporal da composição de espécies das comunidades terrestres próximas das áreas de rejeito seja inicialmente maior mas, com o passar do tempo, que essa variação se torne similar à que ocorre naturalmente nas áreas de referência, ou seja, espera-se um padrão similar de diversidade beta diversidade temporal entre áreas de rejeito e as áreas de referência, com o passar do tempo.

Na escala de populações e indivíduos:

- A hipótese geral é que a degradação ambiental e diminuição da qualidade do habitat em função da presença do rejeito afeta a condição geral de saúde e desenvolvimento dos organismos.
- Espera-se encontrar pior qualidade nutricional (relação lipídios/músculos) e maior assimetria flutuante (AF) em populações de insetos generalistas encontrados em áreas com a presença de manchas de rejeitos se comparadas a áreas de referência;
- Espera-se que, com o tempo, a qualidade nutricional e a assimetria flutuante (AF) se tornem similares entre as populações de insetos generalistas que utilizam as áreas de rejeito e as populações amostradas nas áreas de referência.

Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura e composição das comunidades de insetos terrestre;
- Qualidade nutricional em populações de espécies de insetos;

- Assimetria flutuante em populações de espécies de insetos.

Protocolos metodológicos

Estrutura das comunidades de invertebrados terrestres

Alguns grupos de insetos destacam-se como indicadores de qualidade ambiental por serem especialistas em recursos, apresentarem alta fidelidade ao habitat e ciclo de vida curto (Freitas et al. 2006; Uehara-Prado & Ribeiro 2012). Dessa forma, para responder à pergunta dos efeitos remanescentes da presença da mancha de rejeitos (**efeitos crônicos**) sobre a diversidade de insetos terrestres os seguintes grupos taxonômicos serão avaliados: abelhas, besouros escarabaeíneos, borboletas frugívoras, formigas e libélulas. Tais grupos são comumente usados como bioindicadores e auxiliarão no entendimento dos efeitos crônicos remanescentes da presença da mancha de rejeitos sobre a diversidade, qualidade nutricional e morfometria de insetos como medida de avaliação de instabilidade de desenvolvimento.

Diversas medidas têm sido propostas com o objetivo de estimar os impactos causados nas populações e comunidades pelas modificações do habitat ao longo de gradientes ambientais. Dentre elas, pode-se destacar a avaliação da riqueza e composição de espécies e a mudança na composição específica - diversidade beta, tanto espacial quanto temporal, em áreas sob diferentes graus de impacto ou mesmo em regeneração. A observação das métricas em áreas de deposição de rejeito ou em processo de regeneração e comparadas com áreas de referência permite a avaliação da intensidade das perturbações crônicas ou agudas sobre a biodiversidade terrestre.

Para avaliar os impactos crônicos do evento de derramamento de rejeitos na bacia do rio Doce, utilizaremos os seguintes taxa indicadores: abelhas, besouros escarabaeíneos, borboletas frugívoras, formigas e libélulas, bem como qualidade nutricional e a assimetria flutuante (AF) de asas de borboletas e libélulas.

Para avaliar os efeitos da presença (atual ou pretérita) do rejeito na estrutura de comunidades de insetos e na saúde de indivíduos em florestas remanescentes do domínio espacial do PG30, serão avaliados fragmentos de vegetação natural (estágio médio ou avançado de regeneração), sendo 20 fragmentos alvo, em contato com o rio ou a faixa de depósito do rejeito (PFA) e outros 20 fragmentos de referência, fragmentos sem contato com o rio e fora da faixa de deposição de rejeito (FFR).

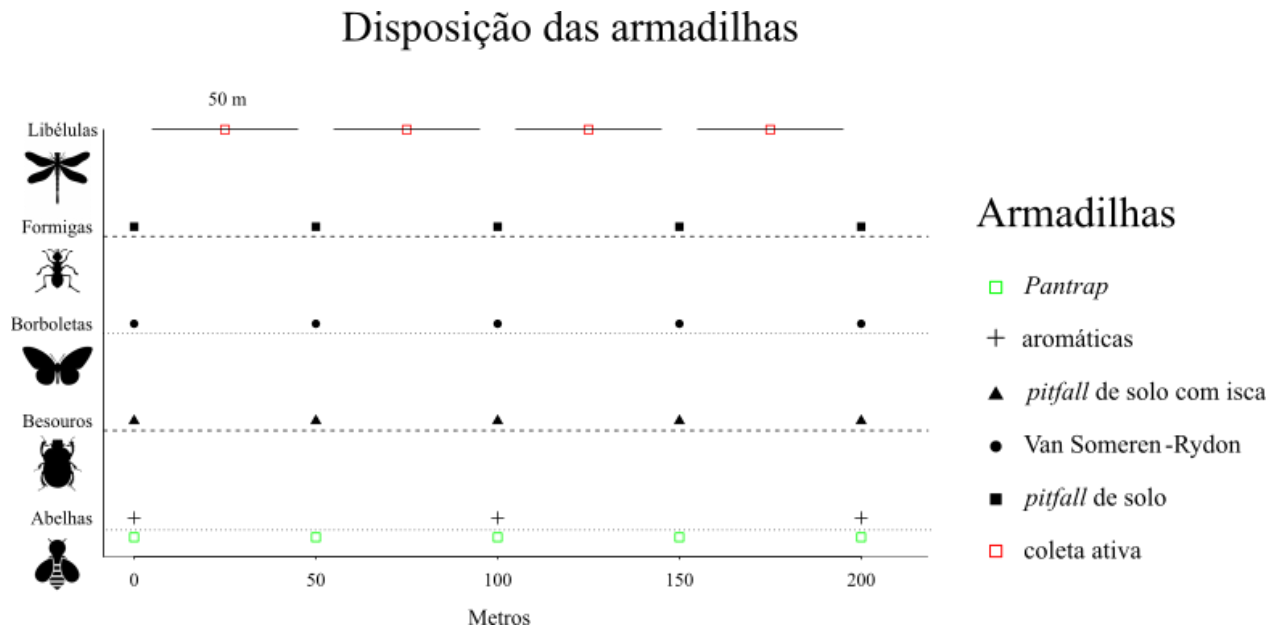
As comunidades devem ser amostradas inicialmente por cinco (5) anos, e as campanhas devem ocorrer anualmente na estação úmida (entre novembro e fevereiro de cada ano). Tal período coincide com a maior atividade e maior ocorrência de insetos em sistemas tropicais sazonais (Johansson et al. 2020). Após cinco (5) anos, avaliar a base de dados e a perspectiva dos efeitos da presença do rejeito, podendo-se estender este prazo.

Em cada fragmento serão realizadas amostragens de insetos utilizando dois transectos como unidades amostrais, sendo um transecto na borda e outro transecto no interior do fragmento, distante pelo menos 100 m da borda. Cada transecto possui uma extensão de 200 m. Os transectos nos fragmentos alvo (PFA) devem ser dispostos paralelamente à margem do rio com a presença do rejeito. Os transectos das áreas de referência (FFR) devem estar distantes pelo menos 500 das áreas PFA.

Os procedimentos descritos abaixo são referentes a uma unidade amostral e devem ser repetidos em todos os

transectos distribuídos nos 40 fragmentos. As amostragens dos taxa sugeridos não devem ser realizadas simultaneamente no mesmo transecto, para evitar a interferência na atratividade das armadilhas e/ou da movimentação de pesquisadores nas amostragens.

Figura 21: Representação esquemática da disposição dos métodos de amostragens de insetos nas unidades amostrais (transecto).



Abelhas (Hymenoptera):

Para a amostragem de abelhas serão utilizadas duas técnicas complementares, armadilhas do tipo *Pantrap* e armadilhas aromáticas. Em cada unidade amostral (transecto) serão dispostas cinco conjuntos de armadilhas do tipo *Pantrap*, distanciadas entre si 50 m, e três kits de armadilhas aromáticas, distanciadas entre si 100 m (Figura 21).

As armadilhas do tipo *Pantrap* consistem em potes pintados com cores no espectro que esses insetos enxergam - o ultravioleta - preenchidos com água com sal e sabão (Popic et al. 2013). Cada conjunto de armadilhas *Pantrap* é composto por três pratos, sendo um amarelo, um azul e um branco. Os pratos ficam dispostos em hastes fixadas em forma de triângulo, com distância entre hastes de 50 cm uma da outra. Cada armadilha deve ser fixada com a utilização de um arame galvanizado e de binder clips e deve ser inserida uma solução salina (150 mL). Após 24 h, as armadilhas devem ser vistoriadas, e todos os indivíduos amostrados devem ser transferidos para um tubo tipo *Falcon* utilizando uma pinça entomológica. Nesse tubo deve ser inserido a etiqueta contendo identificação da amostra, com dados de data, ponto no transecto, transecto, fragmento de coleta e coletor (es). Inserir no tubo *Falcon* um volume de álcool absoluto (o suficiente para as abelhas não fiquem secas quando o tubo estiver deitado). Após 24 h (totalizando 48 h) o procedimento deve ser repetido. Finalmente as armadilhas devem ser recolhidas.

As armadilhas aromáticas são garrafas pet contendo compostos aromáticos e orifícios que permitem o acesso das abelhas a esses compostos. Essa técnica foi desenvolvida para a coleta de insetos conhecidos como abelhas das orquídeas (*Euglossina*) (ver Campos et al. 1989). O kit de essências (iscas) aromáticas para a coleta de abelhas da subtribo *Euglossina* consiste em oito compostos químicos diferentes (acetato de benzila, cinamato de metila, cineol (eucalipitol), escatol, eugenol, salicilato de metila, vanilina e β -ionona) comumente utilizados para amostragem dos machos dessas abelhas (ver Nemésio & Santos Júnior 2014). Cada kit de oito garrafas pet deve conter as oito essências/iscas. Cada essência é inserida em tubos Eppendorf contendo o algodão e inseridos dentro de garrafas pet. Posteriormente em cada garrafa deve ser inserido um volume de solução salina (200 mL). O tubo Eppendorf (contendo uma das essências) deve ser inserido dentro da armadilha aromática, presos ao barbante próximo da tampa da garrafa. A outra extremidade desse barbante é utilizado para amarrar a armadilha na vegetação a cerca de 1,5 m do chão, sendo a distância entre as armadilhas de aproximadamente 50 cm. Cada armadilha deve ser rotulada (e.g., isca cinamato de metila, isca eugenol, etc). Após 24 h as armadilhas devem ser vistoriadas, e todos os indivíduos amostrados devem ser transferidos para um tubo *Falcon* utilizando uma bandeja e uma pinça entomológica. Nesse tubo deve ser inserido a etiqueta contendo identificação da amostra, com dados de data, isca, ponto no transecto, transecto e fragmento de coleta e coletor (es). Inserir no tubo *Falcon* um volume de álcool absoluto (o suficiente para as abelhas não fiquem secas quando o tubo estiver deitado). Posteriormente, caso necessário, os volumes das essências e da solução salina de cada garrafa deve ser completados. Após 24 h (totalizando 48 h) o procedimento deve ser repetido. Finalmente as armadilhas devem ser recolhidas.

Para a triagem, o material amostrado deve ser transferido para uma placa contendo álcool absoluto e deixar por 15 min e posteriormente deixar escorrer o excesso em papel absorvente, com cuidado para manter a identificação. As abelhas devem ser montadas em triângulos ou diretamente em alfinetes entomológicos. Para a fixação dos triângulos ou das abelhas nos alfinetes entomológicos é necessária uma folha de isopor de alta densidade. De cada uma dessas amostras, um indivíduo de cada espécie coletada deverá ser montado e o restante será armazenado em mantas entomológicas. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, isca, ponto no transecto, transecto e fragmento de coleta, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Ao final do processo as abelhas fixadas nos alfinetes/triângulos, devem ser colocadas em uma estufa a 40°C, por 24 a 48 horas. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora.

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de abelhas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies por transecto (unidade amostral).

Besouros escarabaeíneos (Coleoptera, Scarabaeinae):

Para a amostragem de besouros escarabaeíneos serão utilizadas armadilhas de queda do tipo *pitfall* de solo. Em cada unidade amostral (transecto) serão dispostas cinco armadilhas de queda do tipo *pitfall*, distanciadas entre si 50 m (Figura 21). A armadilha do tipo *pitfall* consiste em pote de 1L, enterrado ao nível do solo, com água e detergente. Utilizando uma cavadeira (boca de lobo) e a pá pequena de jardinagem, enterrar o pote plástico de 1L, com a tampa, até nivelar sua abertura no nível do solo. Após enterrar o pote plástico, retirar a sua tampa e inserir a identificação da armadilha, que consiste em uma etiqueta com dados sobre o número da coleta, o número do *pitfall*, identificação do transecto e do fragmento. Preencher cada recipiente (armadilha)

com 250 ml de líquido conservante (mistura de água, 5 g de sal e 5 ml de detergente neutro). Acomodar a isca em cada armadilha: um recipiente plástico de 4 cm de altura e 5 cm de diâmetro (copo plástico de 50 ml) é transpassado por um arame fino e maleável (20 cm de comprimento) na sua borda superior e colocado sobre a armadilha, servindo como porta-isca; adicionar ca. 20 g de isca ao recipiente porta-isca. Como isca será utilizado fezes de porco e fezes humanas, sendo 4 partes de fezes de porco para 1 parte de fezes humanas. Após a instalação da armadilha, montar uma cobertura contra chuva sobre a abertura do *pitfall*, usando um palito de churrasco partido em três partes e servindo como suporte para um prato de plástico. As armadilhas devem permanecer instaladas por dois dias (48 h), posteriormente as armadilhas serão retiradas, o material coletado é transferido para um recipiente plástico (150 ml), utilizando uma peneira de malha fina e uma pinça entomológica, colocando sobre a peneira um tecido do tipo voal (15 cm × 15 cm). Após a transferência, preencher os recipientes plásticos com amostras com álcool absoluto o suficiente para os escarabeíneos não fiquem secos.

Para a triagem o material amostrado deve ser transferido para uma placa de Petri contendo álcool absoluto, e deve ser deixado por 15 min. Os espécimes devem ficar submersos pelo álcool. Posteriormente, colocar os espécimes para secar em papel absorvente em uma bandeja ou placa de Petri. Os escarabeíneos amostrados devem ser montados em triângulos ou diretamente em alfinetes entomológicos. Para a fixação dos triângulos ou dos escarabeíneos nos alfinetes entomológicos é necessária uma folha de isopor de alta densidade. Papel absorvente seco deve ser preso com alfinetes sobre o isopor. Ao final do processo, os escarabeíneos fixados nos alfinetes/triângulos devem ser colocados em estufa a 60°C por 48 h para a secagem sobre um isopor. De cada uma dessas amostras, um indivíduo de cada espécie coletada deverá ser montado e o restante será armazenado em mantas entomológicas. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, ponto no transecto, transecto e fragmento de coleta, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora.

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de besouros escarabaeíneos serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies e a abundância de indivíduos por transecto (unidade amostral).

Borboletas frugívoras (Lepidoptera, Nymphalidae):

Para a amostragem de borboletas frugívoras, em cada unidade amostral (transecto) serão dispostas cinco armadilhas do tipo Van Someren-Rydon (VSR) (DeVries 1987), distanciadas entre si 50 m (Figura 21). As armadilhas seguem as modificadas e adaptações realizadas por Freitas et al. (2014), de acordo com o padrão e dimensões preconizados pela RedeLep do ICMBio (Rede Nacional de Pesquisa e Conservação dos Lepidópteros). Cada armadilha é composta por um cilindro de 80-100 cm de comprimento por 35-40 cm de diâmetro, com a parte superior coberta com plástico para evitar encharcamento da isca e das borboletas. Em cada armadilha será adicionado 10 mL de isca atrativa de macerado de banana fermentada por pelo menos 48 h. A isca será disposta em recipiente plástico no centro da armadilha e estas serão alocadas em campo a uma altura de aproximadamente 1.0 m do solo e, seguindo o proposto por Uehara-Prado et al. (2010), permanecerão em campo por 3 dias consecutivos (até 72 h), com revisões das armadilhas em intervalos de 24h para remoção dos espécimes aprisionados.

Os espécimes coletados nas armadilhas deverão ser removidos em campo, sacrificados pela compressão do tórax, e acondicionados em envelopes entomológicos de papel vegetal identificados com data, armadilha, transecto e fragmento. No laboratório, as borboletas devem ser montadas em esticador de asas entomológico com auxílio de papel vegetal e alfinetes entomológicos 00 ou 01 (37-38 mm), e posteriormente secas e acondicionadas em coleção entomológica para preservação dos espécimes. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, ponto no transecto, transecto e fragmento de coleta, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora. A identificação será feita através de guias, consultas à especialistas e coleções de referência.

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de borboletas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies e a abundância de indivíduos por transecto (unidade amostral).

Formigas (Hymenoptera, Formicidae):

Para a amostragem de formigas epigéicas, em cada unidade amostral (transecto) serão dispostas cinco armadilhas de queda do tipo *pitfall* de solo, distanciadas entre si 50 m (Figura 21). A armadilha do tipo *pitfall* consiste em pote de 1 L, enterrado ao nível do solo, contendo água e detergente. Utilizando uma cavadeira (boca de lobo) e a pá pequena de jardinagem, enterrar o pote plástico de 1 L, com a tampa, até nivelar sua abertura no nível do solo. Após enterrar o pote plástico, retirar a sua tampa e inserir a identificação da armadilha, que consiste em uma etiqueta de papel vegetal com dados sobre o número da coleta, o número do *pitfall*, identificação do transecto e do fragmento. Após a instalação da armadilha, montar uma cobertura contra chuva sobre a abertura do *pitfall*, usando um palito de churrasco partido em três partes e servindo como suporte para um prato de plástico. As armadilhas devem permanecer instaladas por dois dias (48 h), posteriormente as armadilhas serão retiradas e o material coletado é triado. Este método de amostragem de formigas é frequentemente utilizado e apontado como um dos mais eficientes na captura de um grande número de espécimes (Gadagkar et al. 2000). É utilizado para estimar a riqueza e composição de formigas com atividade na superfície uma vez que integra tanto atributos de forrageamento no solo quanto padrões de dispersão das colônias (Bestelmeyer et al. 2000).

Após a triagem, a montagem das formigas é feita com alfinetes, cola branca e triângulos entomológicos (feitos com um cortador de triângulos entomológicos) em isopor de alta densidade. De cada uma dessas amostras, um indivíduo de cada espécie coletada deverá ser montado e o restante será armazenado em novos frascos em meio líquido (álcool 70%). Depois de coladas no triângulo com cola branca, os indivíduos devem ser secos em estufa (ca. 37°C), por 24 ou 48 h. Logo abaixo do triângulo com a formiga, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, ponto no transecto, transecto e fragmento de coleta, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou óleo de cravo. Após a montagem dos espécimes, a identificação será deverá ser realizada através de guias, consultas à especialistas e coleções de referência (ex. Baccaro et al. 2015, Souza et al. 2016).

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de formigas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies por transecto (unidade amostral).

Libélulas (Odonata: Zygoptera e Anisoptera):

A amostragem de libélulas será realizada em cada unidade amostral, na proximidade de riachos, corpos d'água e poças temporárias. Em cada unidade amostral será disposto um transecto de 200 m, na borda dos fragmentos alvo (PFA) e de referência (FFR), paralelo à margem do rio. Cada transecto será dividido em 4 segmentos ("*stretches*") de 50 m, e cada segmento é amostrado por aproximadamente 15 minutos (Figura 21). A coleta ativa dos espécimes será feita com rede entomológica do tipo puçá, confeccionada em tecido tipo voal (ou tecido resistente) e cabo inoxidável. A coleta deverá ser feita em dias ensolarados, entre 10:00 e 14:30 h, calculando-se o esforço amostral por hora. Em campo, os indivíduos devem ser acondicionados em envelopes de papel vegetal, identificados por unidade amostral, segmento, fragmento, data e horário e os envelopes acondicionados em caixa plástica tipo *GerBox* com sílica em gel. Em laboratório, seguindo o protocolo de Lencioni (2006) os envelopes terão as extremidades superiores cortadas em 3 mm e serão imersos em acetona comercial por 3 minutos. Após a imersão, os envelopes devem ser pendurados com a extremidade cortada para baixo, de forma a secar a acetona, por 72 h. Posteriormente, os espécimes são montados utilizando-se alfinetes entomológicos tamanho 0 ou 1, com as asas esticadas em esticador entomológico. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, ponto no transecto, transecto e fragmento de coleta, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora.

Os indivíduos serão identificados com o auxílio das chaves taxonômicas de Garrison (2010), Garrison et al. (2006), Heckman (2006) e Lencioni (2005, 2017) e/ou consulta a coleções entomológicas e especialistas. A coleta e conservação dos espécimes segue o protocolo da Rede Internacional de Odonata (iOdonata.net) e Lencioni (2017).

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de libélulas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies e a abundância de indivíduos por transecto (unidade amostral).

Definição de espécies generalistas de habitat

Espécies generalistas de habitat são aquelas que possuem elevada abundância, derivada de dados coletados em diferentes amostras e em diferentes habitats (Chazdon et al. 2011). A informação sobre a ocorrência, a distribuição e a variação nos atributos de tais espécies generalistas de habitat possui inúmeras aplicações práticas, incluindo a biologia da conservação, o manejo de espécies e de habitats, a seleção de espécies para projetos de restauração e recuperação, além da identificação de conjuntos únicos de atributos que ligam as espécies a habitats em particular (Mayfield et al. 2009).

Serão consideradas espécies generalistas de habitat espécies amostradas com pelo menos 30 indivíduos por fragmento, considerando-se todos os transectos de cada fragmento como réplicas dos tratamentos (PFA e FFR) e cada fragmento como unidade amostral. Tais espécies de abelhas, besouros escarabeíneos, borboletas, formigas e libélulas, selecionadas de acordo com esse critério deverão ser utilizadas para as análises de qualidade nutricional. Além disso, as espécies de borboletas e libélulas selecionadas de acordo com esse critério deverão ser usadas para as análises de morfometria e assimetria flutuante (AF).

Qualidade Nutricional

Recentemente, por meio de ferramentas que avaliam a condição da saúde de indivíduos de insetos é possível saber como as espécies respondem às mudanças ambientais usando as medidas ecofisiológicas (veja Simpson et al. 2015). A qualidade da dieta de um animal depende da ingestão ideal de proteínas, carboidratos e da proporção lipídica que maximiza a sobrevivência individual e o sucesso reprodutivo (Simpson et al. 2015). Assim, indicadores da condição fisiológica de indivíduos podem descrever como está a saúde do inseto e, portanto, a qualidade do habitat onde ele se desenvolveu (Cooke et al. 2013). Utilizando essas ferramentas podemos ter informações sobre o estado de saúde de indivíduos ou populações presentes em áreas em distintas situações de pressões antrópicas ou mesmo condições de estresse ambiental (González-Tokman et al. 2020; Salomão et al. 2018). Dessa forma, a qualidade nutricional pode ser uma ferramenta útil na avaliação da saúde de espécies que se desenvolveram em áreas com a presença da mancha de rejeitos, e caso a mancha tenha um efeito direto ou indireto na saúde do indivíduo, será possível verificar esse efeito através do peso seco, e da quantidade de lipídios e gordura, comparando-se indivíduos amostrados em áreas de presença da mancha de rejeitos com áreas de referência.

Para essa abordagem, devem ser utilizados indivíduos de espécies classificadas como generalistas de habitat de abelhas, besouros escarabaeíneos, borboletas frugívoras, formigas e libélulas, e que foram amostradas tanto nos fragmentos alvo (PFA) quanto nos fragmentos de referência (FFR).

Para a determinação do conteúdo lipídico dos indivíduos coletados, cada espécime deverá ser seco em estufa a 60°C por 48 h, caso o peso não estabilize os espécimes devem retornar para a estufa por mais 24 h. Espécies muito diminutas devem ser agrupadas em grupos de 5 ou 10 indivíduos, amostrados em um mesmo transecto, isso pode ocorrer com insetos sociais como abelhas ou formigas. Após a secagem, os indivíduos (ou grupo de indivíduos) deverão ser transferidos para envelopes de papel vegetal (de peso pré-determinado) e pesados em balança de precisão. Para as análises de borboletas e libélulas, as asas devem ser destacadas cuidadosamente para as medidas de assimetria flutuante e o tórax e abdômen de cada indivíduo devem ser pesados, depois de retirar as pernas, em balança de precisão (10-5 mg). Imediatamente após a pesagem, os indivíduos devem ser acondicionados em vidros ou frascos contendo 5 mL de clorofórmio por 48 h. Após esse período, o tórax e abdômen devem ser novamente acondicionados em estufa seca, a 60°C por 48 h, caso o peso não estabilize os espécimes devem retornar para a estufa por mais 24 h, posteriormente devem ser pesados novamente em balança de precisão. Para os demais grupos (abelhas, besouros escarabaeíneos e formigas) não existe a necessidade de destacar as asas ou pernas. Os insetos são inseridos diretamente nos envelopes de papel vegetal e pesados em balança de precisão. Imediatamente após a pesagem, os indivíduos (ou grupos de indivíduos) devem ser acondicionados em vidros ou frascos contendo 5 mL de clorofórmio por 48 h. Após esse período, devem ser novamente acondicionados em estufa seca, a 60°C por 48 h, caso o peso não estabilize os espécimes devem retornar para a estufa por mais 24 h, posteriormente devem ser pesados novamente em balança de precisão. O conteúdo lipídico deve ser calculado como a diferença em peso seco antes e depois da extração com o clorofórmio (Lee et al. 2004; Peixoto & Benson 2011; Salomão et al. 2018).

Após a determinação de lipídeos, os mesmos indivíduos (ou grupos de indivíduos) devem ser utilizados para a determinação da massa muscular. Imediatamente após a pesagem para a determinação do conteúdo lipídico, os indivíduos (ou grupos de indivíduos) devem ser acondicionados em vidros ou frascos contendo 10 mL de 0.35 M de hidróxido de sódio por 72 h. Após esse período, os indivíduos (ou grupos de indivíduos) devem ser novamente acondicionados em estufa seca, a 60°C por 48 h, caso o peso não estabilize os espécimes devem

retornar para a estufa por mais 24 h, e posteriormente devem ser pesados novamente em balança de precisão. A massa muscular deve ser calculada como a diferença em peso seco após a extração do conteúdo lipídico e depois da extração com o hidróxido de sódio (Marden 1987, Peixoto & Benson 2011; Salomão et al. 2018).

Para as análises, assume-se que cada comunidade associada aos fragmentos é independente e a unidade amostral consiste em cada fragmento com 30 indivíduos de cada espécie generalista. O conteúdo lipídico e massa muscular devem ser usados como as medidas de qualidade nutricional das espécies generalistas, amostrados nos fragmentos alvo (PFA) e referência (FFR).

Assimetria Flutuante

A assimetria flutuante (AF) representa pequenas variações aleatórias na simetria de caracteres bilaterais e tem sido um parâmetro amplamente usado como medida de instabilidade de desenvolvimento em plantas e animais (Beasley et al. 2013). Organismos que se desenvolvem em ambientes de menor estresse são capazes de corrigir erros aleatórios no desenvolvimento (Kozlov et al. 2017) e assim não são produzidos desvios do eixo de simetria bilateral. Com o aumento das pressões antrópicas ou do estresse ambiental, aumenta a probabilidade de instabilidades ou erros de desenvolvimento, que podem ser mensurados como desvios da simetria (Beasley et al. 2013). Dessa forma a AF representa uma ferramenta eficiente para o monitoramento da saúde de plantas e animais sob pressões antrópicas ou mesmo estresse ambiental (Alves-Silva et al. 2018; Henriques & Cornelissen 2019). Assim, a AF pode ser uma ferramenta útil na avaliação da saúde de espécies que desenvolveram em áreas com a presença da mancha de rejeitos, e caso a mancha seja um estresse direto ou indireto para esses organismos, será possível verificar esse efeito através da AF, comparando indivíduos amostrados em fragmentos alvo (PFA) e com fragmentos de referência (FFR). Para isso devem ser utilizadas espécies borboletas frugívoras e libélulas classificadas como generalistas de habitat, e que foram amostradas tanto em PFA quanto em FFR. São utilizados somente esses dois taxa devido a presença de asas membranosas onde os cálculos de AF já são estabelecidos (ver Henriques & Cornelissen 2019; Ryazanova & Polygalov 2014).

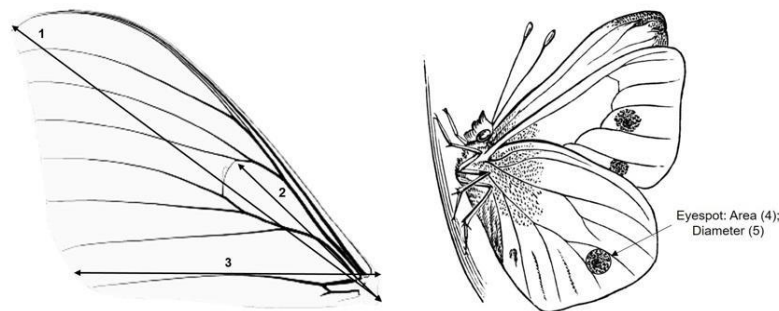
Borboletas frugívoras:

Para a determinação da assimetria flutuante em asas de borboletas, dois critérios de inclusão serão usados: 1) pelo menos 30 réplicas individuais de cada espécie generalista em cada fragmento e 2) as asas direita e esquerda de cada indivíduo devem estar íntegras e em condições apropriadas para as medidas de comprimento, largura e ocelos. Grupos de borboletas coletadas em cada fragmento (PFA e FFR) serão consideradas como comunidades independentes para a avaliação das medidas de assimetria flutuante como indicadora de distúrbios (veja Henriques & Cornelissen 2019, Pignataro & Cornelissen 2020).

A face dorsal das asas direitas e esquerdas de cada indivíduo coletado e preservado serão cuidadosamente destacadas e digitalizadas em mesa digitalizadora, com escala calibrada para 0.01mm. Os atributos morfométricos a serem medidos em cada asa seguem o protocolo de Windig et al. (2000), Adamski & Witkowski (2002) e Henriques e Cornelissen (2019). Esses atributos são comuns às espécies das comunidades, independente de razão sexual, tamanho e idade. Serão avaliados desvios do eixo de simetria perfeita no

comprimento das asas, na largura das asas, na área das asas e tamanho e diâmetro dos ocelos, para as asas esquerda e direita de cada um dos indivíduos amostrados nos critérios 1 e 2 descritos anteriormente. O comprimento será medido da inserção da asa no tórax até a maior medida diagonal da asa (Figura 22, medida 1), cruzando a célula discal no ápice. O comprimento da célula discal (Figura 22, medida 2) será determinado da inserção da asa até o ponto de contato da extremidade da célula discal e a venação imediatamente superior. A largura da asa será medida a partir do mesmo ponto original no tórax até o ponto horizontal máximo na largura em um ângulo de 180° (Figura 22, medida 3), cruzando a célula cubital. A área total das asas será medida através do contorno total das asas direita e esquerda, usando os landmarks externos como referência. Para borboletas, quando presentes, os ocelos serão medidos, avaliando-se a área total (Figura 22, medida 4) e diâmetro do ocelo (Figura 22, medida 5).

Figura 22: Representação esquemática das medidas de assimetria flutuante (medidas 1 a 5) a serem avaliadas nas borboletas. Veja texto para descrição das medidas. As medidas devem ser tomadas nas asas superiores direita e esquerda de cada indivíduo.



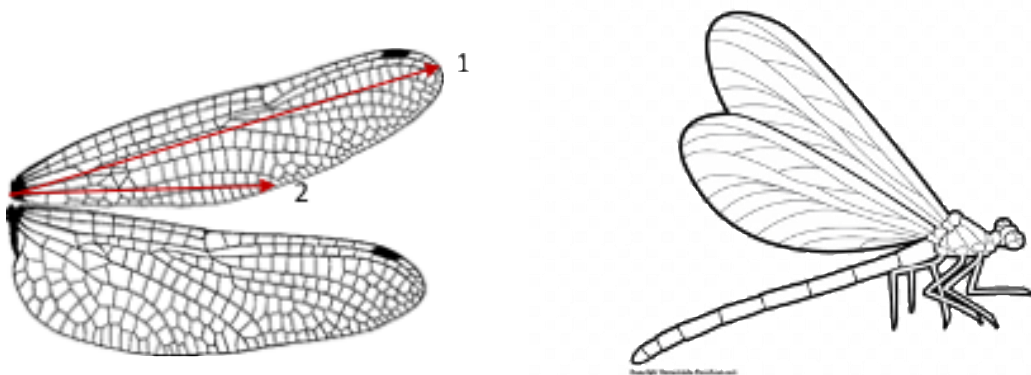
Para as análises de assimetria flutuante (AF), assume-se que cada comunidade associada aos fragmentos é independente e a unidade amostral consiste em cada fragmento com 30 indivíduos de cada espécie generalista. A diferença entre os lados esquerdo e direito das asas superiores dos atributos comprimento da asa, largura da asa, comprimento da célula discal, área e diâmetro dos ocelos (quando presentes) devem ser usados como as medidas de AF das asas de borboletas, comparando-se as medidas através de índices de AF. Tais índices levam em consideração a variância na comunidade dada pela variação interespecífica em variáveis morfométricas como o tamanho corporal e área total das asas.

Libélulas:

Para a determinação da assimetria flutuante em asas de libélulas, dois critérios de inclusão serão usados: 1) pelo menos 30 réplicas individuais de cada espécie generalista em cada fragmento e 2) as asas direita e esquerda de cada indivíduo devem estar íntegras e em condições apropriadas para as medidas de comprimento, largura e distância entre venações. Grupos de libélulas coletadas em cada fragmento (PFA e FFR) serão consideradas como comunidades independentes para a avaliação das medidas de assimetria flutuante como indicadora de distúrbios (veja Henriques & Cornelissen 2019, Pignataro & Cornelissen 2020).

A face dorsal das asas direitas e esquerdas de cada indivíduo coletado e preservado serão cuidadosamente destacadas e digitalizadas em mesa digitalizadora, com escala calibrada para 0.01 mm. Os atributos morfométricos a serem medidos em cada asa seguem o protocolo de Windig et al. (2000), Adamski & Witkowski (2002) e Henriques e Cornelissen (2019). Esses atributos são comuns às espécies das comunidades, independente de razão sexual, tamanho e idade. Serão avaliados desvios do eixo de simetria perfeita no comprimento das asas, na largura das asas, e na área total das asas superiores. As medidas devem ser tomadas nas asas esquerda e direita de cada um dos indivíduos amostrados nos critérios 1 e 2 descritos anteriormente. O comprimento será medido da inserção da asa no tórax até a maior medida diagonal da asa (Figura 23, medida 1), paralelamente à segunda venação. A largura da asa será medida a partir do mesmo ponto original no tórax até o ponto horizontal máximo na largura em um ângulo de 180° (Figura 23, medida 2). A área total das asas será medida através do contorno total das asas direita e esquerda, usando os *landmarks* externos como referência (Figura 23, medida 3).

Figura 23: Representação esquemática das medidas de assimetria flutuante (medidas 1 e 2) a serem avaliadas nas libélulas. A medida 3 (área total da asa) corresponde ao contorno da asa superior, não representada na figura. Ver texto para descrição das medidas. As medidas devem ser tomadas nas asas superiores direita e esquerda de cada indivíduo.



Para as análises de assimetria flutuante (AF), assume-se que cada comunidade associada aos fragmentos é independente e a unidade amostral consiste em cada fragmento com 30 indivíduos de cada espécie generalista. A diferença entre os lados esquerdo e direito das asas superiores dos atributos comprimento da asa, largura da asa, e área total da asa devem ser usados como as medidas de AF das asas de libélulas, comparando-se as medidas através de índices de AF. Tais índices levam em consideração a variância na comunidade dada pela variação interespecífica em variáveis morfométricas como o tamanho corporal e área total das asas.

Pergunta 6 - Áreas diretamente afetadas pelo rejeito apresentam menor abundância do cágado-de-barbichas (*Phrynos geoffroanus*) do que áreas não afetadas, como sugerem os dados da Avaliação Ecológica Rápida? Caso a abundância seja de fato menor em áreas diretamente afetadas, haverá aumento na abundância dessa espécie ao longo de 9 anos, em função das supostas melhorias nas condições ambientais da bacia?

Contextualização:

O cágado-de-barbichas *Phrynos geoffroanus* é um quelônio comum e amplamente distribuído na América do Sul (Rhodin et al. 2017). A espécie possui uma grande plasticidade no uso do habitat, ocorrendo em uma grande variedade de ambientes aquáticos, desde rios e ribeirões até lagoas e açudes, sendo frequentemente encontrada em locais poluídos, onde se adaptam bem (Abe, 2000 2001; Ribas & Monteiro Filho 2002; Rueda-Almonacid et al. 2007; Souza et al. 2008). A grande plasticidade no uso do habitat e a ausência de estudos que comparem a abundância do cágado-de-barbichas em habitats naturais e antropizados fazem com que a espécie, em tese, não seja uma indicadora da boa qualidade ambiental. Por isso, espera-se que o cágado, em uma bacia historicamente já bastante degradada como a do rio Doce, estivesse bem distribuído por ela antes do rompimento, assim como não há motivos para supor que a abundância da espécie fosse muito diferente em trechos da bacia com características similares.

Por outro lado, pode-se supor que a passagem da pluma de rejeito tenha causado a morte de indivíduos de *Phrynos geoffroanus* e uma conseqüente diminuição na sua população. Entretanto, devido à grande capacidade de adaptação da espécie a ambientes alterados, espera-se que as populações da calha dos rios diretamente afetadas pelo rejeito, especialmente do rio Doce, possam se recuperar com o tempo.

Os resultados obtidos durante o primeiro ano do monitoramento sugerem, ainda que de modo não conclusivo, que o cágado-de-barbichas ocorre em menor abundância na calha do rio Doce quando comparada a pontos localizados fora dessa área. Durante o primeiro ano deste trabalho foram capturados 45 indivíduos da espécie, sendo que apenas um foi registrado no leito do rio Doce (Bicho do Mato, 2020). Apesar de possíveis dificuldades relacionadas à amostragem da espécie no rio Doce, o dado obtido levanta a hipótese de que pode haver algum impacto persistente ou recorrente impedindo a recuperação da população dessa espécie no rio Doce, o que justifica o estudo para elucidar essa questão.

Hipóteses e predições

- A hipótese geral é que o desastre tenha afetado populações de espécies sensíveis e/ou associadas à ambientes aquáticos.
- Assumindo que as populações de *Phrynos geoffroanus* anterior ao rompimento eram similares na calha do rio afetado e em seus tributários (referência), espera-se que a abundância atual seja menor em trechos diretamente afetados quando comparados à trechos de referência.
- Espera-se que ao longo do tempo ocorra um aumento na abundância de *Phrynos geoffroanus* em trechos diretamente afetados, aumento esse maior do que aquele observado em trechos de referência. O raciocínio desta hipótese é de que melhorias nas condições ambientais na bacia do rio Doce ocorrerão e devem levar a um aumento das populações de trechos que foram diretamente afetados.

Indicador(es) proposto(s)

- Abundância populacional de *Phrynops geoffroanus*.

Protocolo metodológico

Para avaliar os efeitos da presença (atual ou pretérita) do rejeito na abundância de *Phrynops geoffroanus* deverão ser amostrados 10 trechos de rios, sendo 4 diretamente afetados (alvos) e 6 de referência (não afetados) ao longo da bacia do alto rio Doce (Tabela 11). A abundância da espécie será avaliada utilizando-se a taxa de captura em cada trecho (número de indivíduos capturados dividido pelo esforço amostral). Optou-se por não utilizar métodos de captura-marcação-recaptura, visto o baixo número de recapturas da espécie. Cada trecho deve distanciar pelo menos 1 km um do outro, bem como dos trechos amostrados no projeto de contaminação e danos por metais pesados na espécie (Pergunta 3).

Os trechos alvo corresponderão a trechos diretamente impactados dos rios Gualaxo do Norte e Carmo, até a sua confluência com o rio Piranga. Os trechos de referência, por sua vez, corresponderão a porções de rios da bacia do alto rio Doce não afetados pela passagem do rejeito. Estes trechos devem estar em localizados nas seguintes sub-bacias: Carmo (trecho a montante da sua confluência com o Gualaxo do Norte), Piranga, e Piracicaba. Os trechos de referência podem estar localizados em qualquer altura das sub-bacias supracitadas, entretanto, é importante que dentro do possível tenham vazão compatível à dos trechos afetados. Para excluir potenciais efeitos indiretos do rompimento, os trechos de referência devem estar distantes cerca de 10 km de trechos diretamente afetados. O maior número de trechos referência, quando comparado ao número de trechos alvo, se dá devido à necessidade de se ter uma amostragem representativa da variação da condição referência, sendo para isso necessário amostrar trechos inseridos nas 4 principais sub-bacias do alto rio Doce (acima citadas), além da porção não afetada do próprio rio do Carmo.

O projeto terá a duração inicial de três anos, com periodicidade anual. O primeiro ano funcionará como piloto, o segundo e terceiro como o experimento definitivo. Observa-se que alterações/adaptações metodológicas podem ser realizadas após a realização do piloto, sem, entretanto, modificar a estrutura do desenho amostral. Caso seja constatada que a abundância de *Phrynops geoffroanus* é menor em trechos diretamente afetados quando comparada àquelas de trechos de referência, o monitoramento deverá ser continuado a cada dois anos, até que sejam completados 9 anos. Caso não seja verificada diferença na abundância do cágado entre os tratamentos, o projeto será encerrado ao final do terceiro ano.

A amostragem será realizada por meio de armadilhas do tipo covó/funil (40 x 80 cm) para a captura de quelônios. As armadilhas serão instaladas em pontos que reúnam características adequadas para a captura de cágados, ou seja, que estejam localizados em locais profundos e com pouca correnteza (poções ou remansos), próximos a troncos, pedras e galhadas emersas, em margens com vegetação marginal. Trechos encachoeirados, de corredeiras, excessivamente rasos ou localizados dentro de áreas urbanas devem ser evitados. Remansos de usinas hidroelétricas ou de pequenas centrais hidroelétricas também não devem ser amostrados.

Em cada trecho, deverá ser empregado o esforço diário de 480 horas-armadilha (20 armadilhas abertas por 24 h) aplicado por quatro dias, totalizando de 1920 horas-armadilha por trecho. Após os dois primeiros dias de amostragem as armadilhas deverão ser realocadas e permanecer abertas por mais dois dias. Tal procedimento é indicado visto que normalmente a maior parte dos indivíduos é capturada nos dois primeiros dias e, dessa forma, a relocação das armadilhas permitirá cobrir uma maior extensão dos rios. A taxa de captura em cada

trecho será calculada dividindo-se o número de capturas pelo esforço amostral. As armadilhas deverão estar espaçadas no mínimo 30 metros umas das outras, ou seja, cada conjunto de 20 armadilhas cobrirá a extensão mínima de 570 metros. Considerando a realocação, no total serão cobertos no mínimo 1140 metros de rio.

As armadilhas serão iscadas com lata de sardinha em conserva de óleo perfuradas. A isca deverá ser trocada diariamente. As armadilhas serão instaladas pela manhã e checadas na manhã seguinte. Armadilhas roubadas não deverão ser incluídas no cálculo do esforço amostral.

Tabela 11: Localização dos trechos do monitoramento populacional do cágado-de-barbichas *Phrynops geoffroanus* no alto rio Doce.

Trecho	Categoria	Rio	Dias de amostragem
TA01	Afetada	Gualaxo do Norte	4
TA02	Afetada	Gualaxo do Norte	4
TA03	Afetada	Carmo	4
TA04	Afetada	Carmo	4
TR05	Referência	Carmo (a montante da confluência com o Gualaxo do Norte)	4
TR06	Referência	Carmo (a montante da confluência com o Gualaxo do Norte)	4
TR7	Referência	Piranga	4
TR8	Referência	Piranga	4
TR9	Referência	Piracicaba	4
TR10	Referência	Piracicaba	4
Total			40

Os quelônios capturados serão sexados, pesados, ter o comprimento e largura máxima da carapaça e plastrão medidos. Amostras de tecidos (fragmento da membrana interdigital) deverão ser colhidas e acondicionadas em criotubos com álcool absoluto, de maneira a permitir acesso futuro à informação genética dos espécimes capturados. Os indivíduos deverão ser identificados segundo Gagle (1939) por meio de pequenos entalhes feitos com serra e imediatamente liberados.

Visando restringir o efeito da sazonalidade sobre a abundância de *Phrynops geoffroanus*, as amostragens deverão ser realizadas entre agosto e meados de outubro (antes do início das chuvas fortes), meses com temperatura relativamente elevada e baixa precipitação, condições que influenciam positivamente a atividade da espécie (Souza & Abe, 2001). Ainda, a ausência de trombas d'água na estação seca, faz deste período mais seguro para amostragens. Dessa maneira, considerando os 40 dias efetivos de amostragem (i.e. excluindo-se os deslocamentos entre áreas), serão necessárias, entre três e quatro equipes em campo simultaneamente para que as amostragens possam ser realizadas dentro do período especificado.

Antes de iniciar as amostragens propriamente ditas, deverão ser realizadas campanhas de reconhecimento para avaliação das características dos trechos amostrais, especialmente da vazão, que deve ser compatível, sempre que possível, com a do trecho afetado. O reconhecimento deve ser realizado durante a estação seca,

entre maio e agosto, quando o volume dos rios estará relativamente baixo e similares ao da época estipulada para a amostragem. É importante, durante o reconhecimento, avaliar a necessidade do uso de pequenas embarcações e motor de pouca potência compatível com a navegabilidade para instalação e checagem das armadilhas. O reconhecimento/mapeamento prévio é fundamental visto às possíveis e prováveis dificuldades relacionadas à liberação de acesso a determinados trechos dos rios pelos proprietários. O objetivo final das campanhas de reconhecimento é produzir um mapa com os acessos definidos e as coordenadas geográficas precisas dos pontos exatos onde cada armadilha será instalada, considerando os 40 pontos (20 armadilhas realocadas uma vez). Para o reconhecimento, definição e mapeamento dos trechos e pontos amostrais serão necessários cerca de 40 dias de campo, sem considerar os deslocamentos entre as áreas.

Equipe mínima necessária

O trabalho de campo deve ser executado por biólogos plenos com experiência em estudos com quelônios.

Pergunta 7 - Existem riachos, que tiveram vegetação ripária, calha e margens completamente descaracterizadas pela passagem da onda de rejeito, que abrigam populações de *Hydromedusa maximiliani* em seus trechos localizados a montante da área diretamente afetada? Trechos de riachos recuperados e que abrigam indivíduos a montante da área diretamente afetada serão utilizados por *Hydromedusa maximiliani* em dez anos, na medida em que houver uma melhoria da sua qualidade ambiental em função do processo de restauração ambiental?

Contextualização

Espécies com populações naturalmente pequenas, associadas a habitats específicos e sensíveis a perturbações de origem antrópica, merecem especial atenção quanto à sua conservação, particularmente aquelas ameaçadas de extinção. Esse é o caso do cágado *Hydromedusa maximiliani*, uma espécie endêmica da Mata Atlântica que habita riachos em ambientes florestais (Costa et al. 2015) e encontra-se ameaçada de extinção sob a categoria Vulnerável (VU), segundo as listas estadual e global (COPAM 2010; IUCN 2017). A destruição do habitat e restrita distribuição territorial, além do elevado grau de isolamento de suas populações são as principais ameaças à sobrevivência dessa espécie (Drummond 1998).

A onda de lama resultante do rompimento provocou grandes alterações em drenagens que desaguam no rio Gualaxo do Norte. Riachos circundados por vegetação florestal, onde provavelmente existiam populações de *Hydromedusa maximiliani*, foram total ou parcialmente soterrados, tiveram calha e margens descaracterizadas e vegetação ripária suprimida. Como estratégia de recuperação desses riachos, suas calhas e margens foram reconformadas por meio de enrocamentos, enquanto sua vegetação tem sido restaurada de maneira natural ou assistida.

Passados mais de cinco anos do rompimento, não se sabe se esses trechos de riachos recuperados estão sendo utilizados pelo cágado *Hydromedusa maximiliani*. Devido à grande exigência ambiental da espécie e sua baixa capacidade de dispersão, espera-se que esses trechos ainda não estejam sendo utilizados. Entretanto, caso a restauração seja bem sucedida no longo prazo, espera-se que essa espécie possa retornar a esses trechos.

Hipóteses e predições

- Por ser uma espécie exigente quanto à qualidade do hábitat e com baixa capacidade de dispersão, espera-se, caso a restauração ecológica seja bem sucedida, que trechos de riachos restaurados e que abrigam indivíduos a montante da área diretamente afetada voltarão a ser utilizados pela espécie, porém em dez ou mais anos.

Indicador(es) proposto(s)

- Taxa de ocupação de trechos de riachos por *Hydromedusa maximiliani*.

Protocolo metodológico

Para verificar a taxa de ocupação de trechos de riachos por *Hydromedusa maximiliani* deverão ser considerados apenas os tributários do trecho que vai desde Fundão (córrego Santarém) até o encontro do rio do Carmo com o Piranga. Os tributários amostrados precisam ter pelo menos 50 metros de extensão na ADA, ser permanentes e inseridos em fragmentos de vegetação florestal que toquem a ADA. A partir de um mapeamento visual, utilizando-se imagens de satélite de 2020 (Google Earth) e um shape de drenagens, foram identificados 45 tributários que potencialmente se enquadram nessas condições (Tabela 12). Essas drenagens deverão ser inspecionadas, em campo, visando identificar aquelas que apresentam características adequadas à ocorrência da espécie e que não podem ser verificadas por meio de imagens de satélite (e.g. hidroperíodo, vazão, qualidade da água, presença de remansos, etc.). Para inspeção dos riachos devem ser previstos cerca de 45 dias de campo, realizado por biólogos que conheçam bem a biologia da espécie. Ao final da inspeção, deverão ter sido selecionados pelo menos 10 tributários que possuam características compatíveis com a ocorrência da espécie e que serão posteriormente monitorados.

A taxa de ocupação da espécie nos trechos de riacho selecionados será verificada por meio de armadilhas do tipo covo/funil para a captura de quelônios. Para tal, serão amostrados 3 trechos por riacho, sendo um na ADA, em processo de restauração, outro no trecho localizado dentro da ADA (o *buffer* de 300 m da ADA) e outro em trecho localizado fora da AID (fora do *buffer* de 500 m da ADA). Em cada riacho deverá ser aplicado o esforço de 3240 horas-armadilha, aplicados em 3 dias consecutivos da seguinte forma: 1080 horas-armadilha (15 armadilhas abertas por 72 horas) no trecho da ADA, o mesmo esforço no trecho localizado dentro do *buffer* restritivo de 300 m, e mais 1080 horas-armadilha em trecho localizado fora da AID (fora do *buffer* de 500 m da ADA).

As armadilhas deverão estar espaçadas no mínimo 10 metros umas das outras, ou seja, cada conjunto de 15 armadilhas cobrirá a extensão mínima de 140 metros de riacho. O esforço amostral aplicado em cada riacho poderá sofrer pequenas adaptações em função das características do corpo d'água. Por exemplo, se a extensão do riacho inserida dentro da ADA for muito pequena (e.g. 50 m), o número de armadilhas poderá ser reduzido. As armadilhas serão iscadas com lata de sardinha em conserva de óleo perfuradas. A isca deverá ser trocada diariamente. As armadilhas serão instaladas pela manhã e checadas na manhã seguinte.

Os quelônios capturados serão sexados, pesados e ter o comprimento e largura máxima da carapaça e plastrão medidos. Amostras de tecidos (fragmento da membrana interdigital) deverão ser colhidas e acondicionadas em criotubos com álcool absoluto e depositados em coleção científica. Os indivíduos deverão ser identificados

segundo Gagle (1939) por meio de pequenos entalhes feitos com serra fina e imediatamente liberados.

As amostragens deverão ocorrer em entre fevereiro e maio ou agosto e outubro, evitando os trimestres de temperatura mais baixa (junho – agosto), que diminuem a atividade da espécie ou de alta precipitação (novembro a janeiro), que dificulta a instalação das armadilhas devido aos níveis elevados de água e maior probabilidade de trombas d'água. O número de riachos que será amostrado depende do número de riachos selecionados durante a inspeção prévia (até 10). Assim, a previsão de dias de campo e, conseqüentemente, do tamanho da equipe necessária para execução da amostragem deverá ser feita após o término da inspeção e seleção dos riachos. As amostragens deverão ocorrer anualmente durante os dois primeiros anos. Ao final do segundo ano, caso não seja constatada a ocorrência da espécie em nenhum dos riachos selecionados o monitoramento deve ser encerrado. Caso contrário, o monitoramento deve ser continuado anualmente apenas nos riachos em que a espécie for registrada, até que se completem 10 anos.

Tabela 12: Potenciais tributários para o monitoramento de *Hydromedusa maximiliani*.

Riacho	UTM 23K		Riacho	UTM 23K	
1	664938	7758095	24	676939	7758391
2	663238	7760198	25	675128	7759786
3	663059	7760675	26	675279	7760205
4	664422	7757207	27	675222	7760764
5	666528	7758044	28	674745	7761104
6	666241	7758121	29	673075	7761547
7	666306	7760223	30	672824	7761369
8	667652	7760242	31	672023	7760338
9	668923	7760973	32	671633	7759915
10	669096	7760682	33	670773	7759839
11	669082	7759912	34	669999	7760342
12	669220	7759286	35	669523	7761094
13	671677	7759088	36	669052	7761876
14	671930	7759579	37	668784	7761902
15	673694	7760558	38	668426	7761516
16	673627	7760179	39	667070	7761052
17	673862	7759979	40	665984	7761609
18	677304	7757241	41	665151	7762430
19	677984	7755951	42	664787	7762545
20	685993	7753033	43	664196	7762435
21	689206	7757621	44	661460	7762345
22	679814	7756425	45	664834	7757125
23	680029	7756236			

Equipe mínima necessária

A ausência de registro de *Hydromedusa maximiliani* em um riacho muitas vezes decorre da inexperiência do profissional responsável pela escolha dos microambientes onde as armadilhas serão instaladas. Portanto, sugere-se que a escolha desses locais seja realizada por um biólogo sênior com experiência na amostragem da espécie. As amostragens subsequentes podem ser realizadas por biólogos plenos.

Pergunta 8 - Existem diferenças entre as comunidades da avifauna de áreas afetadas pela deposição de rejeito e em áreas de floresta não submetidas a este estressor? Se sim, quais são estas diferenças?

Contextualização

Diversos estudos efetuados na Mata Atlântica apontam modificações nas comunidades de aves diante de processos de descaracterização de ambientes florestais, a exemplo de fragmentação de habitat, efeito de borda, fogo e manejo relacionado ao corte seletivo ou uso agroflorestal (Willis 1979; Aleixo 1995, 1999, 2001; Aleixo & Vielliard 1995; Christiansen & Pitter 1997; D'Angelo-Neto et al. 1998; Soares & Anjos 1999; Bornschein & Reinert 2000; Maldonado-Coelho & Marini 2000, 2003, 2004; Marini 2000; Anjos 2001a, b; Marsden et al. 2001; Protomastro 2001; Laps et al. 2003; Ribon et al. 2003; Faria et al. 2006; Piratelli et al. 2008; Uezu et al. 2008; Anjos et al. 2009, 2011; Loures-Ribeiro et al. 2011; Uezu & Metzger 2011, 2016; Martensen et al. 2012; Barbosa et al. 2017; Matos et al. 2018). No entanto, nem sempre a riqueza de espécies e a diversidade são bons indicadores, já que ambientes florestais depauperados ou em estágio inicial de regeneração podem ser ocupados por uma ampla variedade de espécies generalistas e típicas de borda (e.g., Aleixo & Vielliard 1995; D'Angelo-Neto et al. 1998; Anjos 2001a, b; Ribon et al. 2003; Modena et al. 2013; Emer et al. 2018; Silva et al. 2020).

Todavia, os seguintes padrões gerais são observados com relação à sensibilidade da avifauna da Mata Atlântica (Brooks & Balmford 1996; Christiansen & Pitter 1997; Goerck 1997; Brooks et al. 1999; Aleixo 2001; Marsden et al. 2001; Pizo 2001; Willis & Oniki 2002; Laps et al. 2003; Anjos et al. 2004; Anjos 2006; Uezu et al. 2005; Faria et al. 2006; Martensen et al. 2008; Uezu et al. 2008; Anjos et al. 2010; Loures-Ribeiro et al. 2011; Uezu & Metzger 2011, 2016; Alexandrino et al. 2016; Emer et al. 2018; Campos-Silva & Piratelli 2020; Silva et al. 2020):

1. Em florestas secundárias, fragmentadas ou submetidas a intervenções antrópicas há diminuição do número de espécies de aves endêmicas da Mata Atlântica.
2. Em florestas secundárias, fragmentadas ou submetidas a intervenções antrópicas há diminuição do número de espécies de aves dependentes de ambientes florestais.
3. Em florestas secundárias, fragmentadas ou submetidas a intervenções antrópicas há diminuição do número de aves de médio e grande porte (com massa corporal superior a 50 g) que consomem frutos, compreendendo as representantes das seguintes famílias: Tinamidae (macucos, inhambus e jaós), Cracidae (jacus, mutuns e jacutingas), Phasianidae (urus e capueiras), Columbidae (pombas, juritis e pararus), Trogonidae (surucuás), Ramphastidae (tucanos e araçarís), Psittacidae (papagaios, araras e periquitos) e Cotingidae (arapongas, anambés e pavós).

4. Em florestas secundárias, fragmentadas ou submetidas a intervenções antrópicas há diminuição do número de aves insetívoras que capturam suas presas no piso das florestas, a exemplo de representantes das famílias Formicariidae (pintos-do-mato), Grallariidae (tovacas) e Scleruridae (vira-folhas).
5. Em florestas secundárias, fragmentadas ou submetidas a intervenções antrópicas há diminuição do número de aves insetívoras de sub-bosque, principalmente aquelas que dependem de substratos específicos para forragear, a exemplo de representantes das famílias Thamnophilidae (chocas e afins), Dendrocolaptidae (arapaçus) e Furnariidae (trepadores e afins).

Estudos indicam, ainda, que as espécies indicadoras da boa qualidade ambiental na Mata Atlântica são representantes dos grupos acima destacados e geralmente constam em listas vermelhas de espécies ameaçadas de extinção, especialmente quando há sinergia de um ou mais desses atributos (Machado et al. 1998, 2008; Goerck 1997; Brooks et al. 1999; Aleixo 2001; Ribon et al. 2003; Bencke et al. 2006; Alexandrino et al. 2016; ICMBio 2018; IUCN 2020). Por outro lado, em áreas alteradas, há um aumento na ocupação por espécies generalistas, de ampla distribuição geográfica, que não dependem de florestas, com baixa sensibilidade a distúrbios de origem antrópica e não presentes em listas vermelhas, incluindo espécies exóticas (Aleixo & Vielliard 1995; Aleixo 2001; Willis & Oniki 2002; Matos et al. 2018).

Assim, com base na categorização das espécies nos atributos acima elencados, as próprias comunidades de aves podem ser tratadas como indicadores do grau de preservação ou do estágio sucessional de ambientes florestais na área de estudo.

Hipóteses e predições

- A hipótese geral é que a degradação em fragmentos florestais impactados pela presença do rejeito irá alterar a estrutura e composição da comunidade de aves.
- Espera-se que a comunidade de aves de áreas afetadas pela deposição de rejeito apresente uma proporção menor de espécies indicadoras da boa qualidade ambiental em comparação com as áreas de referência. As espécies indicadoras da boa qualidade ambiental incluem aves ameaçadas de extinção, endêmicas da Mata Atlântica, dependentes de ambientes florestais, consumidores de frutos de médio e grande porte e insetívoras de solo e sub-bosque.
- Espera-se que a proporção de espécies indicadoras da boa qualidade ambiental aumente com o aumento da distância da área diretamente afetada.

Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura e composição das comunidades de aves de interior de mata.

Protocolo metodológico

A malha amostral necessária é composta por 20 sítios amostrais de cada um dos seguintes grupos de ambientes: 1) fragmentos florestais de vegetação natural em estágio médio ou avançado de sucessão ecológica e que foram diretamente afetados pela deposição de rejeito em sua totalidade ou em apenas uma porção de sua área. Estes sítios correspondem às Porções de Fragmentos Alvo (PFA) definidas no item “Definição da Malha Amostral”; 2) fragmentos florestais de vegetação natural em estágio médio ou avançado de regeneração e que não receberam deposição de rejeito, devendo também estar localizados fora da AID (buffer de 500 m em

relação à ADA). Estes serão os fragmentos florestais de referência (FFR).

Uma vez que diversos estudos envolvendo outros grupos temáticos serão desenvolvidos nestes mesmos sítios amostrais, um planejamento cuidadoso deve ser realizado de modo a minimizar os impactos do estudo no ambiente e no bom andamento dos trabalhos de campo. Para isso, a rede de acessos aos pontos e parcelas de amostragem deverá ser planejada de modo a reduzir ao máximo a necessidade de abertura de novas trilhas e o pisoteio do sub-bosque, minimizando assim os impactos sobre o ambiente. Os trabalhos de campo dos diferentes profissionais envolvidos neste programa deverão ser coordenados de modo a evitar que pesquisadores responsáveis por diferentes grupos temáticos trabalhem simultaneamente em um mesmo sítio de amostragem, de modo que um grupo não interfira nos trabalhos de campo do outro grupo.

A periodicidade das campanhas de coleta deverá ser semestral, sendo uma campanha de amostragem durante a estação seca (maio a agosto) e outra durante a estação chuvosa (outubro a março). A duração mínima do monitoramento deverá ser de cinco anos, com avaliação da necessidade de continuidade ao final desse período, pois frequentemente existe um considerável lapso de tempo entre um impacto e a extinção de espécies.

A coleta de dados se dará por meio de pontos de contagem (Bibby et al., 2000; Gregory et al., 2004). Objetivando tornar os procedimentos de coleta em campo mais ágeis e eficientes, os sítios amostrais deverão ser agrupados de acordo com a sua proximidade geográfica e facilidade de acesso. Desse modo será possível que dois ou mesmo três sítios possam ser amostrados em um único dia (sempre respeitando o limite máximo do horário de amostragem aqui estabelecido). A ordem de amostragem de cada um desses agrupamentos de sítios, bem como a ordem de amostragem de cada sítio individual dentro de um agrupamento, deverá ser sorteada. Uma vez que mais de uma equipe de campo poderá realizar a coleta de dados (ver abaixo), é importante que se garanta a alternância de equipes entre amostragens sucessivas de um mesmo sítio durante cada uma das campanhas. Estes procedimentos objetivam reduzir eventuais vieses de amostragem.

Ao chegar em campo, o ornitólogo sênior, acompanhado do seu auxiliar, se deslocará em silêncio até o ponto de contagem e, logo após sua chegada ao ponto, iniciará a identificação e contagem de todas as espécies de aves visualizadas ou escutadas em um raio de 50 m ao redor do ponto durante um período de 10 min (Bibby et al., 2000). Espécies registradas fora do raio de contagem do ponto deverão ser registradas com o propósito de compor a lista completa das espécies identificadas em cada sítio de amostragem, não devendo ser utilizadas nas análises estatísticas que exijam a coleta de dados sistematizados. O mesmo deverá ocorrer com as espécies identificadas fora dos períodos de contagem, como, por exemplo, durante os deslocamentos entre os pontos.

O ornitólogo sênior deverá estar atento durante todo o período de censo para evitar a recontagem de indivíduos dentro de um mesmo ponto e mesmo entre pontos distintos. O ornitólogo auxiliar ficará responsável por realizar a documentação sonora durante todo o período do censo utilizando o gravador digital. Imediatamente antes do início da gravação sonora do censo, o ornitólogo auxiliar deverá gravar um trecho curto de áudio que servirá como legenda das gravações subsequentes, anunciando a data, os nomes dos ornitólogos responsáveis pelo censo e pela gravação, o nome do sítio de amostragem, o número do ponto de contagem e o horário de início da gravação. A gravação dos censos objetiva não apenas a documentação por meio de vouchers digitais das espécies registradas, mas também possibilitar a posterior verificação independente dos registros obtidos em campo.

A documentação fotográfica poderá ser realizada pelo pesquisador sênior ou por seu auxiliar durante o período de censo ou, preferencialmente, durante os deslocamentos entre pontos. A documentação fotográfica não deverá interferir no bom andamento dos pontos de contagem, pois, afinal, a identificação e contagem de aves é o objeto principal das amostragens, não a documentação fotográfica. Além do mais, a documentação sonora irá prover os vouchers digitais da maioria das espécies encontradas na área de estudos.

Os censos deverão ser realizados sempre nas primeiras horas da manhã, iniciando com o nascer do sol e se encerrando até no máximo às 09h30 da manhã, preferencialmente mais cedo, especialmente em dias de calor muito intenso. Dias chuvosos ou com vento forte não deverão ser amostrados, pois condições meteorológicas adversas podem influenciar negativamente nas amostragens (Bibby et al., 2000). Cada ponto será amostrado duas vezes em cada campanha, sempre em dias distintos. A sequência de amostragem dos pontos deverá ser alternada entre cada amostragem, de modo a reduzir eventuais vieses decorrentes do horário de amostragem. Uma vez que este é um trabalho de monitoramento de comunidades, não deverão ser coletados espécimes nos sítios de amostragem, de modo a não interferir nos resultados dos censos subsequentes.

Cada fragmento deverá receber quatro pontos de contagem, os quais deverão estar preferencialmente dispostos ao longo de um único transecto linear. Entretanto, devido à limitada disponibilidade de fragmentos florestais com porte adequado, este desenho linear poderá ser modificado em virtude das dimensões e conformação do fragmento, mas sempre respeitando a distância mínima entre pontos e em relação à borda.

Cada ponto de contagem deverá estar separado de outros pontos por no mínimo 200 m de distância, preferencialmente mais do que 300 m, de modo a garantir a independência amostral de cada ponto (Bibby et al., 2000). Cada ponto deverá também estar distante no mínimo 50 m da borda, preferencialmente mais do que 100 m, de modo a garantir que a comunidade amostrada esteja realmente associada ao fragmento florestal e não à matriz adjacente. Trilhas de acesso deverão ser abertas de modo a permitir o deslocamento rápido, ágil e seguro do pessoal de campo até os pontos de contagem. As trilhas deverão ser abertas de maneira linear (para agilizar o deslocamento) e bem marcadas, porém estreitas, de modo a impactar o mínimo possível o ambiente e o comportamento das aves. É importante que as trilhas sejam mantidas bem limpas (i.e. sem galhos, arbustos e/ou cipós impedindo o livre caminhar), de modo a reduzir o ruído durante o deslocamento dos pesquisadores.

A taxonomia e sistemática das espécies registradas deverão seguir o checklist publicado pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Piacentini et al., 2015) ou uma eventual atualização que porventura venha a ser publicada por este comitê. A listagem dos taxa endêmicos da Mata Atlântica deverá seguir Moreira-Lima (2013). Embora esta seja uma dissertação de mestrado não publicada, a qualidade dos dados é muito superior ao apresentado por outras fontes publicadas que apresentaram uma listagem similar (Brooks et al., 1999; Silva et al., 2004). As espécies ameaçadas de extinção deverão ser aquelas oficialmente reconhecidas como tal em nível estadual (COPAM, 2010) e nacional (MMA, 2014), considerando também eventuais revisões das listas vermelhas. Espécies quase-ameaçadas de extinção ("NT") também deverão ser consideradas.

A massa corporal das espécies identificadas deverá seguir Rodrigues et al. (2019) ou, na ausência de dados disponíveis para a Mata Atlântica, Dunning (2008). Dados sobre o estrato de forrageamento podem ser obtidos em Parker et al. (1996), devendo receber a mesma codificação apresentada pelos autores desta base de dados (terrestre, sub-bosque, estrato médio, dossel, aéreo e aquático).

Dados sobre o tipo de habitat podem ser obtidos em Parker et al. (1996), que indica, em ordem decrescente de importância, os habitats utilizados por cada uma das espécies de aves Neotropicais. Para efeito de análise dos dados, as espécies identificadas em campo deverão ser classificadas como dependentes (habitam predominantemente florestas), semi-dependentes (têm forte relação com o componente arbóreo, mas habitam predominantemente capoeiras e bordas de fragmentos florestais, transitando bem por uma matriz de áreas abertas e semiabertas), e independentes de floresta (habitam predominantemente áreas abertas). A classificação das espécies em cada um dos três níveis de dependência florestal deverá ser feita com base no habitat primário de cada espécie (*sensu* Parker et al., 1996), adotando-se o seguinte critério: dependentes de floresta (habitats F1, F2, F4, F5, F6, F7, F9, F10, F11); semi-dependentes de floresta (F3, F8, F12, F13, F14, F15, além de espécies associadas a bordas “edge species”, que são assinaladas com um “E”); e independentes de florestas (todas as espécies associadas com ambientes não florestais, N1-N14 e aquático, A1-A12). Devido ao baixo nível de conhecimento sobre os habitats utilizados pelas aves Neotropicais, bem como para acomodar preferências locais de espécies de ampla distribuição, alguns ajustes na classificação proposta pelo grupo liderado por Parker podem ser necessários.

Dados sobre a dieta das aves poderão ser obtidos em Wilman et al. (2014). Este banco de dados informa a porcentagem de cada categoria alimentar que compõe a dieta de cada espécie, em intervalos de 10% (e.g. 70% de invertebrados e 30% de frutos para o sabiá *Turdus leucomelas*). Devido ao baixo nível de conhecimento sobre a dieta de aves Neotropicais, alguns ajustes na classificação proposta pelo grupo liderado por Wilman podem ser necessários. Nestes casos, estudos descritivos e com amostragem realizadas na Mata Atlântica deverão ser utilizados (e.g. Moojen et al., 1941; Schubart et al., 1965; Lopes et al., 2005; Lima et al., 2010; Manhães et al., 2010; Sabino et al., 2017).

Dados sobre o tamanho da área de distribuição geográfica das espécies poderão ser extraídos dos mapas digitais disponibilizados pela Birdlife International (2020). Estes dados permitirão estimar quão ampla é a distribuição geográfica das espécies de interesse.

Uma vez que a coleta de dados será realizada por meio de pontos de contagem, poucos equipamentos especializados serão necessários. Uma listagem desses equipamentos, com exemplos das especificações de marcas e modelos recomendados, é apresentada abaixo:

- GPS. Para auxiliar a navegação em campo e garantir que as amostragens serão realizadas nos pontos apropriados, um aparelho GPS portátil será fundamental (e.g. Garmin eTrex 22x GPS/GLONASS).
- Binóculo. Para a observação e identificação das aves em campo, cada pesquisador deverá contar com um binóculo de boa qualidade (e.g. Nikon Monarch HG 8x42 ou Zeiss Conquest HD 8x42).
- Gravador e microfone. Para a gravação dos áudios durante os censos será necessário um gravador digital (e.g. Sound Devices MixPre-3 II) acoplado a um microfone direcional (e.g. Sennheiser ME-67 microphone head associado ao K6 powering module). Um cabo conector XLR, sempre acompanhado de um cabo reserva, será necessário para conectar o microfone ao gravador, que deverá ser acomodado em um case de proteção sob medida para o aparelho. Para garantir a máxima qualidade da gravação, uma empunhadura (e.g. Rycote Lyre Mount with Pistol Grip Handle) e um protetor contra ventos (e.g. Rycote Standard Hole Softie Windscreen, 19-22mm hole size, internal length 29cm) são também recomendados.
- Câmera digital. Para a realização da documentação fotográfica das aves em campo, bem como dos ambientes amostrados, uma câmera digital de alta qualidade dotada de um zoom poderoso

será fundamental. Como a preferência por marcas e modelos de equipamento fotográfico varia dramaticamente entre profissionais, não serão aqui apresentadas recomendações.

Devido à extensa malha amostral necessária para se responder adequadamente à esta pergunta, serão necessárias de duas a no máximo três equipes de campo, cada uma delas composta por um ornitólogo sênior e um ornitólogo auxiliar de campo. Uma vez que a capacidade de detecção varia entre observadores (Bibby et al., 2000; Gregory et al., 2004), é importante limitar o número de equipes ao mínimo necessário, evitando-se a substituição de membros das equipes entre as campanhas. Dessa forma-se reduz-se a inserção de eventuais vieses nas amostragens.

Os ornitólogos sêniores deverão ter no mínimo oito anos de experiência com inventários de aves em campo, incluindo censos por pontos de contagem. É fundamental que estes profissionais comprovem experiência prévia de no mínimo quatro anos com a avifauna da região de estudos, pois a metodologia aqui adotada exige um amplo conhecimento das espécies locais. Os ornitólogos auxiliares deverão ter no mínimo quatro anos de experiência de campo com inventários de aves, devendo comprovar experiência no uso do gravador. Para a análise dos dados e redação do relatório de estudo será necessário um profissional doutor com no mínimo oito anos de experiência em análise de dados e redação científica.

Pergunta 9 - Existem diferenças na diversidade funcional da avifauna em áreas afetadas pela deposição de rejeito e em áreas de floresta não submetidas a este estressor? Se sim, quais são estas diferenças?

Contextualização

Na Mata Atlântica, estudos apontam para a presença de várias espécies de aves polinizadoras persistindo em áreas alteradas e em pequenos fragmentos florestais, sugerindo que esta função ecológica possa ser preservada, mesmo diante da perda de algumas espécies mais sensíveis (Willis 1979; Ribon et al. 2003; Anjos et al. 2004), especialmente levando-se em consideração que espécies de plantas pioneiras ou típicas de bordas (não necessariamente ornitófilas) podem fornecer recursos alimentares para essas aves (Willis 1979; Vieira et al. 1992; Olmos & Boulhosa 2000; Abreu & Vieira 2004). Além disso, muitas espécies de beija-flores apresentam boa capacidade de deslocamento a médias e longas distâncias, em busca de recursos alimentares (Willis 1979; Sick 1997). Por outro lado, alguns autores apontam que a degradação do habitat pode levar à perda de algumas espécies de beija-flores com morfologia e estratégias de forrageamento únicas, comprometendo a polinização das espécies de plantas ornitófilas mais especializadas (Dalsgaard et al., 2008; Maglianesi et al., 2014; Tinoco et al., 2016; Hadley et al., 2018).

Com relação a dispersores de sementes, áreas alteradas e fragmentadas tendem a ser representadas por espécies de aves generalistas (onívoras) de pequeno tamanho corporal e que interagem com plantas de rápido crescimento que apresentam frutos pequenos (Willis 1979; Silva & Tabarelli 2000; Manhães et al. 2003; Emer et al. 2018). Por outro lado, grandes frugívoros tendem a desaparecer dessas áreas, comprometendo a dispersão de espécies com sementes maiores (Willis 1979; Aleixo & Vielliard 1995; Christiansen & Pitter 1997; Silva & Tabarelli 2000; Ribon et al. 2003; Uezu et al. 2005; Galetti et al. 2013; Emer et al. 2018), com raras exceções (e.g., Fadini & De Marco Jr. 2004; Uezu & Metzger 2011).

Neste contexto, o subconjunto das comunidades a serem amostradas, representado por aves com potencial

para atuar como polinizadoras (nectarívoras) ou dispersoras de sementes (onívoras e frugívoras) pode ser usado como indicador.

Hipóteses e predições

- A hipótese geral é que a degradação ambiental nos fragmentos impactados pelo rejeito reduz de maneira heterogênea a diversidade de espécies de aves, alterando assim algumas funções ecológicas executadas pela avifauna.
- Espera-se encontrar diferenças na composição, na abundância e na diversidade funcional de aves polinizadoras entre as áreas afetadas pela deposição de rejeito e as áreas de referência.
- Espera-se que nas áreas afetadas pela deposição de rejeito haja maior proporção de dispersores onívoros, menos dependentes de florestas e de pequena massa corporal, ao contrário das áreas de referência, onde se espera a presença de dispersores mais especializados, incluindo frugívoros florestais de maior porte.

Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade de aves polinizadoras e dispersoras.

Protocolo metodológico

A malha amostral, a periodicidade e duração do monitoramento, a quantidade e disposição das unidades amostrais (pontos de contagem), o detalhamento dos equipamentos de coleta e o perfil técnico da equipe são os mesmos descritos para a Pergunta 8 acima. Os procedimentos de coleta relativos às aves frugívoras (pontos de contagem) também serão os mesmos daqueles empregados para as demais aves, indicados na Pergunta 8.

Já para as espécies nectarívoras, especificamente beija-flores, será adotada uma metodologia específica. Para isso serão conduzidos censos de beija-flores nos mesmos pontos utilizados para a amostragem por pontos de contagem, porém utilizando bebedouros comerciais abastecidos com solução de sacarose como atrativo (as populares “garrafinhas de beija-flor”). Optou-se aqui pelo uso de bebedouros em detrimento de flores naturais em virtude da possibilidade de se obter com eles um maior controle do sistema de estudos. Isso porque as diferentes espécies de flores ornitófilas apresentam níveis muito distintos de atratividade para os beija-flores, variando também dramaticamente a sua disponibilidade e abundância ao longo do ano e do estágio de sucessão dos fragmentos florestais amostrados.

Deverão ser instalados dois bebedouros por ponto de contagem a aproximadamente 1,5 m de altura, distantes aproximadamente 5 metros um do outro. Os bebedouros deverão ser fixados em galhos finos ou cipós naturalmente presentes no local, sempre em lugares expostos e visíveis, de modo a facilitar a sua localização e visitação pelos beija-flores. Beija flores exibem uma forte preferência por flores com cores nos comprimentos de onda do extremo mais elevado do espectro visível (Stiles, 1976), ou seja, flores nas cores vermelha e alaranjada (bebedouros comerciais frequentemente exibem uma combinação dessas cores). É bom evitar amarelo, pois esta cor é muito atrativa para abelhas (<https://www.allaboutbirds.org/news/feeding-hummingbirds/>). É fundamental que todos os bebedouros utilizados ao longo do experimento sejam rigorosamente padronizados.

Os bebedouros deverão ser abastecidos com solução açucarada na proporção de 125 gramas de açúcar cristal

de cana para cada litro de água (Ruschi, 1949). Esta solução poderá permanecer por no máximo quatro dias nos bebedouros (Becker et al., 2013), os quais deverão ser rigorosamente higienizados e reabastecidos com uma nova solução açucarada após esse período. Dessa maneira evitar-se-á a fermentação exagerada do líquido e a proliferação de fungos, os quais podem ser prejudiciais à saúde dessas aves (Ruschi, 1949). Dependendo da intensidade de visitação poderá ser necessário reabastecimento dos bebedouros em intervalos mais curtos. Caso ocorra a infestação dos bebedouros por abelhas, o que pode inibir a visitação por beija-flores, algumas medidas simples poderão ser empregadas para minimizar o problema (ver <https://www.wikiaves.com.br/wiki/comoatrairasaves:bebedouros>).

Os bebedouros deverão permanecer em campo por pelo menos dois dias antes de que os censos sejam realizados, de modo a permitir a habituação dos beija-flores (Kormann et al., 2016). Uma vez que a identificação de beija-flores em voo e sob condições de baixa luminosidade não é uma tarefa trivial, ambos os ornitólogos em campo deverão participar do censo, com cada um deles focando em um único bebedouro por vez. Imediatamente após a chegada ao ponto ambos os ornitólogos iniciarão a identificação de todas as espécies de beija-flor escutadas ou visualizadas durante um período de 25 min (Bibby et al., 2000). Uma vez que o foco deste estudo é a polinização, deverá ser registrada se as espécies identificadas foram registradas ou não visitando os bebedouros. Para as espécies registradas visitando os bebedouros deverá ser contado o número de visitas realizadas aos bebedouros instalados no ponto. Uma vez que os beija-flores não estarão marcados, não será necessário ou mesmo possível a contagem do número de indivíduos registrados. Deverão ser consideradas visitas distintas todas as vezes que um beija-flor trocar de bebedouro ou então que um indivíduo da mesma espécie for observado novamente visitando o bebedouro, após o primeiro indivíduo alvo sair do campo de visão do ornitólogo (i.e. não será mais possível determinar se é o mesmo indivíduo ou um outro que está visitando o bebedouro). Devido à baixa taxa de vocalização da maioria dos beija-flores durante a visitação, associado às dificuldades técnicas de se realizar uma filmagem de qualidade sob as condições prevalentes no sub-bosque, não será necessário qualquer tipo de documentação digital do áudio ou filmagens durante os censos de beija-flores. A documentação fotográfica poderá ser realizada eventualmente, mas sempre com extremo cuidado para não interferir no bom andamento dos trabalhos de campo.

Beija-flores registrados fora dos períodos de contagem, como, por exemplo, durante os deslocamentos entre os pontos deverão ser registradas com o intuito de compor a lista de espécies do sítio de amostragem, não devendo ser incluídas nas análises de dados sistematizadas.

Beija-flores são espécies com elevado grau de atividade durante o dia, mesmo durante as horas mais quentes, não havendo, portanto, a necessidade de que os censos fiquem restritos às primeiras horas da manhã. Entretanto, as amostragens não deverão ocorrer em dias chuvosos, com vento muito forte ou em momentos de calor extremo, pois condições meteorológicas adversas podem influenciar negativamente nas amostragens (Bibby et al., 2000). Cada ponto deverá ser amostrado duas vezes em cada campanha, sempre em dias distintos. A sequência de amostragem dos pontos deverá ser alternada entre cada amostragem e os observadores deverão trocar de posição durante o monitoramento dos bebedouros, de modo a reduzir eventuais vieses.

É muito importante que os censos de beija-flores sejam realizados sempre após as amostragens dos censos por pontos, de modo a não interferirem nos resultados destas por meio da atração de espécies nectarívoras. Uma possível estratégia para maximizar a eficiência dos trabalhos de campo e reduzir o número de deslocamentos é os pesquisadores instalarem os bebedouros no sítio amostral imediatamente após encerrarem

os pontos de contagem (Pergunta 8), no seu caminho de volta para o veículo. Assim eles poderão retornar dois dias depois para fazerem a contagem dos beija-flores. Após o segundo dia de contagem dos polinizadores, os bebedouros deverão ser removidos.

Para as análises com foco no grupo indicador constituído pelos polinizadores, apenas a família Trochilidae (constituída pelos beija-flores) será considerada. Esta família inclui as principais aves polinizadoras das Américas, abrangendo elevada riqueza de espécies e grande abundância de indivíduos nas mais diversas paisagens naturais e antropizadas (Schuchmann, 1999). Embora representantes de outras famílias de aves Neotropicais (e.g. Thraupidae) também se alimentem de néctar, estas aves geralmente possuem um papel secundário como polinizadores ou mesmo, em alguns casos, atuam como “ladrões de néctar” (Stiles, 1981).

Para as análises com foco no grupo indicador constituído pelas aves frugívoras, serão consideradas como desempenhando um papel relevante na dispersão de frutos todas as espécies listadas por Wilman et al. (2014) como apresentando 20% ou mais de frutos na sua dieta. Devido ao baixo nível de conhecimento sobre a dieta de aves Neotropicais, alguns ajustes na classificação proposta pelo grupo liderado por Wilman podem ser necessários. Nestes casos, estudos descritivos e com amostragens realizadas na Mata Atlântica deverão ser utilizados (e.g. Moojen et al., 1941; Schubart et al., 1965; Lopes et al., 2005; Lima et al., 2010; Manhães et al., 2010; Sabino et al., 2017).

A taxonomia e sistemática das espécies registradas deverão seguir o checklist publicado pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Piacentini et al., 2015) ou uma eventual atualização que porventura venha a ser publicada por este comitê. A massa corporal média das espécies deverá seguir Rodrigues et al. (2019) ou, na ausência de dados disponíveis para a Mata Atlântica, Dunning (2008). Dados sobre a morfometria dos beija-flores (comprimento do bico e comprimento da asa) poderão ser obtidas em Rodrigues et al. (2019), Grantsau (1988) e Rodríguez-Flores et al. (2019). O grau de curvatura do bico dos beija-flores é uma importante variável relacionada à eficiência de polinização de muitas plantas ornitófilas. Esta informação pode ser obtida, de forma categórica, em Rodríguez-Flores et al. (2019). Dados sobre a largura do bico na base (“gape”) de aves frugívoras, uma importante variável relacionada ao tamanho do fruto possível de ser ingerido, podem ser obtidos em Rodrigues et al. (2019) e em outras fontes da literatura (e.g. Foster, 1987; Galetti et al., 2013). Caso não seja possível localizar na literatura dados morfométricos de algumas das espécies de interesse, é possível realizar a medida de espécimes taxidermizados em coleções ornitológicas (e.g. acervos da UFMG, UFV, MZUSP e MNRJ, entre outras). É importante ter em mente que existem diferentes maneiras de se medir uma ave. Portanto, é necessário checar nas fontes consultadas como as medidas foram tomadas, sempre especificando durante a análise dos dados qual foi a medida padrão adotada (e.g. no caso do comprimento do bico, se a medida utilizada foi o cúlmen total ou o cúlmen exposto). Duas boas fontes de referência para a padronização de medidas morfológicas de aves são Baldwin et al. (1931) e Eck et al. (2011).

Dados sobre o estrato de forrageamento podem ser obtidos em Parker et al. (1996), devendo receber a mesma codificação apresentada pelos autores da base de dados (terrestre, sub-bosque, estrato médio, dossel, aéreo e aquático). Dados sobre o tipo de habitat utilizado podem ser obtidos em Parker et al. (1996), que indica, em ordem decrescente de importância, os habitats utilizados por cada uma das espécies de aves Neotropicais. Para efeito de análise dos dados, as espécies identificadas em campo deverão ser classificadas como dependentes (habitam predominantemente florestas), semi-dependentes (têm forte relação com o componente arbóreo, mas habitam frequentemente capoeiras jovens e bordas de fragmentos florestais, transitando bem por uma matriz de áreas abertas e semi-abertas), e independentes de floresta (habitam predominantemente áreas

abertas). A classificação das espécies de interesse em cada um dos três níveis de dependência florestal deverá ser feita com base no hábitat primário de cada espécie (Parker et al., 1996), adotando-se o seguinte critério: dependentes de floresta (hábitats F1, F2, F4, F5, F6, F7, F9, F10, F11); semi-dependentes de floresta (F3, F8, F12, F13, F14, F15, além de espécies associadas a bordas “edge species”, que são assinaladas com um “E”); e independentes de florestas (todas as espécies associadas com ambientes não florestais, N1-N14 e aquático, A1-A12). Devido ao baixo nível de conhecimento sobre os hábitats utilizados pelas aves Neotropicais, bem como especificidades locais daquelas espécies de ampla distribuição, alguns ajustes na classificação proposta pelo grupo liderado por Parker podem ser necessários. Dados sobre as diferentes estratégias de forrageamento exibidas por beija-flores (sensu Feinsinger & Colwell, 1978) podem ser encontrados na literatura (e.g. Justino et al., 2012; Las-Casas et al., 2012; Lanna et al., 2017).

Pergunta 10 - A presença da mancha de rejeitos nas margens dos cursos d’água afeta a composição e estrutura da comunidade de pequenos mamíferos nos fragmentos impactados?

Contextualização

Diversos trabalhos reportam efeitos de distúrbios nas comunidades biológicas (Vera Y Conde & Rocha, 2006; Laurance et al., 2007). Algumas dessas perturbações podem levar a alterações negativas sobre as populações e comunidades de espécies de um dado local. Pequenos mamíferos é um grupo formado por animais com peso inferior a 2kg, composto por roedores e marsupiais (Eisenberg, 1999). É um dos grupos de mamíferos mais diversificados, englobando diversos grupos e guildas ecológicas (Paglia et al, 2012). Em ambientes florestais, os pequenos mamíferos podem ser encontrados nos diversos estratos da mata e algumas espécies transitam entre o estrato terrestre e o dossel das árvores (Vieira e Monteiro-Filho, 2003; Paglia et al, 2012, Reis et al, 2011). Diversas espécies são preferencialmente terrestres, com algumas de hábito semifossorial (Wilson & Reeder, 2005). Por possuírem área de vida reduzida e estarem fortemente associados ao estrato terrestre, algumas espécies podem ser indicadoras do impacto da deposição do rejeito. A alteração do habitat pela passagem da mancha de rejeitos pode ter causado impactos sobre a comunidade de pequenos mamíferos ao afetar a oferta e disponibilidade de recursos alimentares e abrigo.

Hipóteses & Predições

- A hipótese geral é que a presença de rejeito nos fragmentos florestais impactados atue como filtro ambiental afetando a comunidade de pequenos mamíferos terrestres.
- Espera-se que a diversidade (taxonômica e funcional), composição e estrutura da comunidade de espécies de pequenos mamíferos nos fragmentos florestais diretamente impactados pela presença de rejeito seja diferente daquela encontrada nas áreas de referência.
- Espera-se que o efeito da presença de rejeito sobre a composição da comunidade de pequenos mamíferos diminua da borda para o interior do fragmento.
- Espera-se que com o tempo a composição de espécies de pequenos mamíferos nas áreas afetadas se aproxime daquela presente nas áreas de referência.

Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura e composição das comunidades de pequenos mamíferos terrestres.

Protocolo metodológico

Para o monitoramento da diversidade, estrutura e composição das comunidades de pequenos mamíferos serão amostrados os 40 sítios indicados no tópico de definição da malha amostral, sendo 20 fragmentos Alvo (PFA) e 20 fragmentos Referência (FFR) no trecho Fundão - UHE Risoleta Neves. Em cada fragmento florestal serão estabelecidos dois transectos, sendo um na borda do fragmento e outro no interior, a uma distância mínima de 100 metros. Em cada transecto serão definidos 15 postos de captura, equidistantes cerca de 15 metros entre si. Em cada posto serão instaladas duas armadilhas de captura viva (*live trap*), uma do modelo gaiola de arame galvanizado (tipo gancho) (32x15x15 cm) e outra modelo Sherman (25x8x9 cm). Uma armadilha será disposta no solo e a outra, sempre que possível, em média altura (cerca de 1,5 m), presa em galhos ou cipós. As armadilhas de captura viva serão iscadas com farinha de milho, banana e farinha de amendoim e serão vistoriadas a cada manhã tendo as iscas renovadas após cada captura ou sempre que necessário. Adicionalmente em cada transecto serão instalados um conjunto de 10 armadilhas de interceptação e queda (*Pitfall traps*) constituído de baldes de 60 l em linha, interligados por lona. As armadilhas ficarão operantes durante cinco noites consecutivas, por campanha, quando então serão retiradas ou tampadas. Para a coleta de amostras para avaliação de contaminantes as campanhas de campo deverão ser semestrais, acompanhando a periodicidade das coletas relativas ao protocolo metodológico da Pergunta 6. As coletas deverão ter uma duração programada de no mínimo 5 anos, sendo analisados os resultados ao final do segundo ano para avaliação da continuidade do monitoramento de contaminantes.

5.2. TEMA 2: HÁ UMA TENDÊNCIA DE AUMENTO DE CONDIÇÕES AMBIENTAIS FAVORÁVEIS PARA O RESTABELECIMENTO DE POPULAÇÕES DE ANIMAIS E PLANTAS E DOS PROCESSOS ECOLÓGICOS AFETADOS PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM?

5.2.1 Bases conceituais

A cobertura florestal tem se transformado profundamente nas últimas décadas no Brasil e no mundo (Sloan et al. 2019). De início, vastas extensões de florestas tropicais maduras foram convertidas para usos agropecuários, resultando em um drástico declínio da cobertura florestal em paisagens transformadas pelo homem. No entanto, muitas dessas paisagens têm passado por um processo de transição florestal, resultando numa reversão da tendência histórica de perda de cobertura florestal e dando início a uma fase de ganho de cobertura (Nanni et al. 2019). Como consequência, a cobertura florestal que era antes constituída essencialmente de florestas nativas maduras tem se transformado num mosaico bastante heterogêneo de diferentes tipologias florestais, cada qual com funções ambientais específicas e, conseqüentemente, diferentes contribuições para a natureza e bem-estar humano. No entanto, pouco se sabe sobre onde estão essas novas florestas e suas diferentes tipologias, como elas provêm diferentes funções ambientais e como essas funções poderiam ser maximizadas para a conservação da natureza como o bem-estar humano (McDowell et al. 2020).

A perda de área nativa de floresta associada às margens dos córregos atingidos pelo rompimento da barragem, tem efeito imediato local. Todavia, para muitas espécies, os efeitos de modificações em escala local podem reverberar na escala da paisagem. Além disso, é importante entender como os diferentes compartimentos da

paisagem influenciam as comunidades de organismos, para detectar e diferenciar os efeitos diretos do rompimento da barragem (impacto avaliado) dos impactos já existentes na paisagem em questão (impacto de fundo). Estes impactos de naturezas distintas podem levar as comunidades a processos de homogeneização biótica, em geral derivados dos impactos intensos e agudos (Chenson & Huntly 1997; Solar et al. 2015).

Por outro lado, os impactos de fundo, crônicos na paisagem, podem levar à divergência da composição das comunidades, de acordo com a hipótese da divergência das comunidades (Laurance et al. 2007). Os efeitos de cada um desses impactos variam dentro de um contínuo em que, num primeiro momento, os filtros impostos pelo derramamento de rejeito afetam a homogeneização das espécies, seguido da dispersão aleatória das espécies na paisagem, que se caracteriza como a principal causa de variação (divergência) (Solar et al. 2015; Socolar et al. 2016). Neste sentido, é necessário monitorar os efeitos dos impactos detectados de perda de habitat terrestre e consequente perda de indivíduos, levando-se em consideração tanto as áreas afetadas e sua recuperação, bem como um conjunto de áreas de referência.

Ainda, se for possível escalar a restauração com qualidade na paisagem, será necessário demonstrar isso em números, mas os protocolos de monitoramento de áreas em restauração, apesar de apresentar resultados muito interessantes (Ribeiro et al. 2015, Londe et al. 2019; Montoya et al. 2019; Rother et al. 2019), ainda são muito restritos em termos espaciais, com custo muito elevado (Viani et al. 2017), que dificilmente permitirá ganhar escala no monitoramento. Assim, novas tecnologias de monitoramento estão sendo testadas recentemente, baseadas em uso de imagens de satélite de alta resolução (e.g. Global Forest Watch), integrando com algoritmos robustos para explorar a dinâmica de uso da terra (e.g. MapBiomass) e até com ciência participativa (Evans et al. 2018). Há, ainda, a possibilidade de usar drones acoplados a equipamentos LiDAR de detecção, de localização e sensores hiperespectrais (Almeida et al. 2020), que são metodologias que têm o potencial de revolucionar a forma como áreas em restauração podem ser monitoradas, localmente e na paisagem.

Como integrar essas tecnologias de monitoramento baseado em imagens com conhecimento ecológico no nível de parcela (e.g. inventários florestais, diversidade funcional), de forma relevante para avaliar com qualidade e escalas áreas em restauração florestal, é ainda um grande desafio para a ciência, porém, que pode ser superado se recursos e capacidades adequados forem combinados em programas de monitoramentos, como empregados pela Fundação Renova. Assim, associado aos programas de restauração ecológica das áreas degradadas pelo rompimento da barragem, deverá também ser planejado o monitoramento permanente das áreas em restauração, localmente e na paisagem, com foco na restauração da biodiversidade, da estrutura, composição e do provimento de serviços ecossistêmicos, quando comparado com ecossistemas de referência (Londe et al. 2019), principalmente focando em organismos de respostas rápidas, que estejam associadas com funções ecossistêmicas desejáveis.

5.2.2 Pergunta e indicadores relacionados à tendência de melhoria na bacia

Pergunta 11 – É possível detectar uma mudança ambientalmente positiva na estrutura e composição da paisagem natural na bacia do rio Doce ao longo do tempo

Contextualização

A bacia do rio Doce apresenta uma grande variação na sua cobertura de vegetação nativa. Estima-se que no todo, cerca de 17% da bacia possui cobertura de floresta atlântica. Alguns trechos da bacia estão em melhor condição ambiental que outros, sendo o trecho do médio rio Doce o mais degradado. O mapeamento do uso e cobertura do solo na bacia do rio Doce elaborado pelo IBIO AGB-Doce em 2013, utilizando dados espaciais de 2008 a 2012, indica que apenas cerca de 27% da bacia possui cobertura de vegetação nativa e 59% está ocupada por pastagem (ANA, 2016).

Também é notório na bacia a baixa cobertura das Áreas de Proteção Permanente nos cursos d'água. A Fundação Renova, através do PG26, tem o compromisso de recuperar 40.000 ha de APP e 5.000 nascentes na bacia. Essa meta representa apenas 0,4% da extensão territorial da bacia do rio Doce.

A fragmentação e perda de habitats são os principais vetores de ameaça à biodiversidade terrestre. Na Mata Atlântica, estima-se que os remanescentes florestais correspondam a cerca de 28% da cobertura original no bioma (Rezende et al, 2018), portanto, a bacia do rio Doce, que está praticamente toda inserida nos limites do bioma, é bem representativa do processo histórico de degradação da Mata Atlântica, talvez apenas mais recente do que em outras regiões. A proporção de habitat remanescente determina as respostas das espécies e populações ao processo de fragmentação (Fahrig, 2013). Relações não lineares entre biodiversidade e quantidade de habitat remanescente determinam, por sua vez, limiares críticos de respostas das espécies (Magioli, et al, 2015; Boesing et al, 2018). Os valores dos limiares críticos variam entre espécies, porém alguns estudos indicam que entre paisagens com menos de 35% de cobertura florestal remanescente são críticas para persistência de espécies de vertebrados terrestres (Andrén, 1994; Martensen et al., 2012; Estavillo et al., 2013; Banks-Leite et al., 2014; Muylaert et al., 2016, Santos et al., 2019).

Uma das visões gerais sobre a atuação da Fundação Renova é que ela seja capaz de entregar uma bacia em condições melhores do que estava antes do rompimento da barragem. A meta de recuperar 40.000 ha de APPs do PG26 é importante, porém numa escala regional, pouco irá contribuir para melhorar a condição geral da bacia. Entende-se que as ações da Fundação Renova devem contribuir e influenciar uma série de ações e políticas públicas tendo como objetivo a melhoria da cobertura de áreas de vegetação nativa na bacia. Assim, é importante monitorar a dinâmica do uso e cobertura do solo através de métricas de paisagem que indiquem melhoria da qualidade ambiental para a biodiversidade terrestre.

Hipóteses & predições

- A hipótese geral é que as ações de restauração executadas pela Renova, bem como a articulação entre as diversas instituições e entidades atuantes na bacia do rio Doce, irão contribuir com a melhoria na cobertura de vegetação nativa na bacia.

- Espera-se que tenham sido planejadas e venham a ser executadas ações que levem a compensação das florestas eliminadas, bem como ao aumento da conectividade natural da paisagem.
- Espera-se que com o tempo as diversas ações irão levar em conta a realidade de fragmentos antes do rompimento da barragem, buscando não só melhorar os fragmentos naturais remanescentes, mas restaurar fragmentos na nova paisagem, garantindo o provimento de serviços ecossistêmicos na escala da paisagem, e não só no local restaurado.
- Considerando que a restauração ecológica permite melhorias dos descritores ambientais em comparação às áreas degradadas, mas raramente alcança os descritores de áreas naturais remanescentes, espera-se que a restauração planejada e a já executada no domínio espacial do PG30 consiga melhorar as métricas de paisagem em relação à condição original, antes do rompimento da barragem

Indicador(es) proposto(s)

- Métricas de paisagem (proporção de cobertura de vegetação nativa, tamanho dos fragmentos, conectividade, etc).

Protocolo metodológico

Para quantificar a área de floresta nativa que foi eliminada com o derramamento de rejeito e a modificação na cobertura de vegetação a partir do rompimento, deverá ser avaliado a cobertura florestal nativa, na faixa ribeirinha onde ocorreu a deposição direta de rejeito (faixa da ADA), no domínio espacial do PG30, considerando diferentes momentos temporais, sendo uma amostragem um ano antes do derramamento de rejeito (2015); uma segunda amostragem um ano após o derramamento do rejeito (2016), uma terceira amostragem no tempo presente, e a partir disso, medições bianuais, durante os próximos 10 anos, com avaliação após 5 anos.

Em cada um dos tempos indicados acima, cada mancha de cobertura florestal nativa deverá ser quantificada em hectares e classificada de acordo com seu estado de sucessão (estágios inicial, médio e final), usando os parâmetros definidos na Resolução CONAMA nº 7, de 23 de Julho de 1996, na Resolução CONAMA nº 417, de 23 de novembro de 2009 e na Instrução Normativa nº 5, IBAMA, de 20 de abril de 2011.

A quantificação e classificação da cobertura florestal nativa na faixa da ADA em cada tempo deverá ser feita analisando em SIG imagens de satélite de alta resolução espacial (0,3 à 5m de resolução), semelhante a resolução usada pela Fundação Renova, nas avaliações temporais do impacto do derramamento.

Os resultados de quantificação e classificação da cobertura florestal nativa na faixa da ADA deverão ser tabulados e analisados no sentido de expressar as perdas e ganhos de cobertura florestal em hectares entre os tempos, considerando cada estágio de degradação. Para a análise da cobertura florestal nativa do tempo 3, o *layer* da restauração já realizada pela Fundação Renova deverá ser sobreposto na imagem, permitindo diferenciar o quanto da cobertura florestal nativa identificada é de vegetação remanescente e o quanto é resultado de ações de restauração.

Para avaliar qual é a tendência de alteração da paisagem da bacia do rio Doce desde o derramamento de rejeito, deverá ser usado o MapBiomas, Coleção 5.0 ou superior, de uso e ocupação do solo, usando a unidade

de fragmento florestal nativa, ao longo do tempo, sendo o primeiro tempo um ano antes do derramamento de rejeito (2015); a segunda medição um ano após o derramamento do rejeito (2016) e a partir dessa data, outras medições anuais durante os próximos 10 anos, com avaliação após o quinto ano. A análise de uso do solo e estrutura e composição da paisagem deverá ser feita considerando três escalas espaciais: 1- As quatro subbacias do trecho entre Fundão e a UHE Risoleta Neves; 2- Todas as subbacias nas quais estão inseridas as áreas sob restauração do PG26; 3- toda a bacia do Rio Doce, para fins de comparação da evolução das métricas de paisagem nos trechos sob intervenção da Fundação Renova.

Para cada análise de tempo e para cada análise de espacialização deverão ser avaliada a cobertura florestal e calculada as métricas de paisagem mais comumente usadas nesse tema (Metzger et al., 2009, Banks-Leite et al., 2014, Tambosi et al. 2014, Resende et al 2018, Wagner et al. 2020), como: 1- porcentagem de cobertura florestal por unidade da paisagem; 2- classes de tamanho dos fragmentos florestais nativos; 3- métricas de conectividade da paisagem; 4 - quantificação do efeito de borda dos fragmentos florestais nativos e outras de interesse para demonstrar alterações temporais na paisagem da bacia do Rio Doce.

5.3. TEMA 3: AS AÇÕES DE RESTAURAÇÃO, RECUPERAÇÃO E COMPENSAÇÃO DA BACIA DO RIO DOCE ESTÃO LEVANDO À RECUPERAÇÃO DA FLORA, FAUNA E FUNCIONAMENTO DO ECOSISTEMA? OBSERVA-SE MELHORIA NA ABUNDÂNCIA, DISTRIBUIÇÃO OU RIQUEZA DE ESPÉCIES OU GRUPOS FUNCIONAIS AMEAÇADOS, SENSÍVEIS OU CHAVE, NOS DIFERENTES CONTEXTOS AFETADOS?

5.3.1 Bases conceituais

O Brasil se comprometeu a restaurar e reflorestar 12 milhões de hectares, como parte de seu compromisso junto ao *Bonn Challenge* e ao acordo climático de Paris, objetivo este alinhado às demandas legais para reduzir o déficit de vegetação nativa em Áreas de Preservação Permanente e Reservas Legais, e coordenado por meio do Plano Nacional de Recuperação da Vegetação Nativa. Em nível de bioma, destaca-se a meta do Pacto pela Restauração da Mata Atlântica de restaurar 15 milhões de hectares de florestas nativas até 2050 (Melo et al. 2013).

Diversas regiões da Mata Atlântica já apresentam um ganho líquido de cobertura florestal, tendo sido observado o ressurgimento de mais 700.000 ha de florestas nativas entre 2011 e 2015 (Crouzeilles et al. 2019). A restauração de mais de 40 mil ha da bacia do rio Doce, em pouco mais de 10 anos (Meira Neto et al. 2020), conforme comprometimento da Fundação Renova, vai trazer grande contribuição para o cumprimento da meta brasileira de restauração. No entanto, é preciso atentar que a restauração ecológica sempre traz melhorias dos descritores e dos serviços ambientais quando comparada com áreas degradadas, mas quando comparadas com vegetação natural remanescente, os descritores são sempre inferiores aos ecossistemas de referências (Benayas et al. 2009).

Métodos, políticas, instrumentos legais e de mercado vêm sendo desenvolvidos para tentar viabilizar essa

restauração florestal em larga escala e com qualidade (Rodrigues et al. 2009), mas ainda são insuficientes para permitir a restauração efetiva de milhões de hectares com a qualidade comparada a ecossistemas de referência (Holl 2017; Fagan et al. 2020). Há necessidade premente de uma mudança de paradigma na forma como a conservação é planejada, implementada e monitorada, e dependerá da compreensão da dinâmica da mudança no uso de terras e das preferências dos proprietários, em determinadas paisagens, para identificar aquelas de maior custo-eficiência, em termos de metodologias de menor custo e maior sucesso na restauração dos descritores, de baixa competição com uso agrícola e maior potencial de contribuir com a melhoria socioeconômica e o do bem-estar humano do proprietário (Strassburg et al 2019).

Dentre as principais causas de ameaças à biodiversidade terrestre no Antropoceno destaca-se a perda de habitats, causada pela transformação dos ecossistemas naturais para o uso antrópico direto ou por mudanças do uso da terra (Pimm et al. 2014; Chase et al. 2020). Essas alterações podem ter efeitos em várias escalas biológicas, que podem se manifestar de distintas formas (Pinek et al. 2020). Distúrbios abruptos ou contínuos podem alterar qualidade do habitat e disponibilidade de recursos, afetando a biodiversidade e causando a perda de serviços essenciais como a polinização, a manutenção da qualidade do ar e do solo, a qualidade da água, a ciclagem de nutrientes e a regeneração de habitats. Essas alterações podem ser detectadas e monitoradas através do uso sistemático de respostas biológicas para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópicas (Rosenberg & Resh 1993).

As respostas biológicas podem ser percebidas com o monitoramento de grupos de organismos conhecidos como bioindicadores de qualidade do habitat, utilizados para monitorar a saúde do ambiente onde vivem (Parmar et al. 2016). Espécies bioindicadoras fornecem informações sobre os ambientes que ocupam e apresentam sensibilidade a alterações dos atributos do habitat. Tais atributos envolvem desde características climáticas, físico-químicas e estruturais do habitat, mas também mudanças causadas por atividades antrópicas como a poluição, mudança na quantidade e qualidade do habitat, e mudanças no uso da terra, como a urbanização e a mineração. Um grupo é considerado bom indicador biológico quando: apresenta sua taxonomia bem definida, fácil identificação, distribuição geográfica ampla, ciclo de vida curto em relação à duração do estressor, padrões de distribuição em diferentes condições ambientais e de interações biológicas bem definidas.

5.3.2 Perguntas e indicadores relacionados ao processo de regeneração e recuperação ambiental da biota terrestre pós-desastre.

Pergunta 12 - A restauração florestal planejada ou realizada no domínio espacial do PG30, como compensação da destruição oriunda do rompimento da barragem, vai conseguir restaurar a biodiversidade (taxonômica, filogenética e funcional), incluindo as espécies ameaçadas, sensíveis ou chaves, a estrutura, o funcionamento e o provimento de serviços ecossistêmicos, tendo os ecossistemas naturais mais conservados (estágio médio e avançado de regeneração) como referência?

Contextualização:

Uma das principais limitações ao desenvolvimento da flora nas áreas diretamente afetadas é, além da presença de contaminantes, a limitação nutricional e o impedimento físico ocasionado pela compactação do rejeito (Matos et al. 2020). Parte dos impactos são atribuídos à redução da biomassa microbiana, do teor de matéria orgânica e nitrato, aumento nas concentrações de amônio, sódio e pH, os quais são considerados vetores de toxicidade

maiores do que os metais Fe, Cu, Mn e Zn (Santos et al. 2019).

A concentração de metais acumulados nas plantas é mais fortemente relacionada com os metais disponíveis do solo do que com a concentração total de metais (Shen et al. 2017; Galhardi et al. 2020). Portanto, análises da concentração de metais nas áreas de amostragem devem envolver não apenas a concentração pseudototal ou total, mas, também, as frações disponíveis, pois estas podem alterar significativamente a depender das condições físico-químicas do sedimento.

A associação dos contaminantes na flora com os metais presentes no solo impõe a definição dos mesmos pontos de coleta, inclusive para fins de acompanhamento das alterações das condições do solo (presença de matéria orgânica, alteração das propriedades físico-químicas, aporte de nutrientes) ao longo do tempo, em face das várias ações executadas nessas áreas. Assim, é possível monitorar a disponibilidade dos contaminantes com o tempo e com as ações em andamento. Conforme demonstrado por diversos trabalhos realizados nas áreas impactadas com rejeitos de mineração, as melhorias das condições físico-químicas, como matéria orgânica, correção de pH e aporte de nutrientes, tem potencial mitigador dos danos e favorecem o desenvolvimento da vegetação (Scotti et al. 2020). A matéria orgânica promove a ligação dos metais pesados, reduzindo a sua absorção pelas plantas (Zago et al. 2019) e a migração dos metais no ambiente (Gagnon et al. 2020). Além da presença dos contaminantes, a alta densidade apresentada pelos tecnosolos limita a recuperação da vegetação (de Fátima Esteves et al. 2020).

Hipóteses e predições

- A hipótese geral é que a restauração ambiental proporciona condições físico-químicas favoráveis para o estabelecimento da flora.
- Espera-se que as ações de restauração nas áreas afetadas pela deposição de rejeito (naturais ou em processo de restauração) promoverão, ao longo do tempo, uma melhoria na condição geral do solo. Esta melhoria dar-se-á, ao longo do tempo:
 - Pela redução da fração disponível de metais pesados no solo.
 - Pela promoção de maior aporte de matéria orgânica e nutrientes, resultando em melhores condições para o desenvolvimento vegetal ao longo do tempo.
 - Pela redução no acúmulo de metais pesados pelas plantas.
 - Pelas melhorias nas condições físicas do Tecnosolo facilitando o desenvolvimento radicular das plantas.
- Considerando que restauração ecológica permite melhorias da diversidade e funcionamento de habitats degradados, mas raramente consegue restaurar a diversidade e funcionamento quando comparados com áreas naturais remanescentes na mesma situação, espera-se que a restauração tenha sido planejada, no domínio espacial do PG30, para conseguir restaurar pelo menos parte importante da diversidade perdida e do funcionamento da vegetação natural, tendo como referência a vegetação natural fora dos limites de degradação do rompimento da barragem.
- A restauração ecológica, mesmo que muito bem planejada e executada, tem grande dificuldade de restaurar diversidade taxonômica (Alfa e Beta), filogenética e funcional da área, quando comparada a ecossistemas de referência regionais. Assim, uma outra hipótese é que a restauração já implantada nesse trecho da bacia não permitirá a restauração mínima desses atributos e precisa ser replanejada, em termos de metodologia de implantação e manutenção, para reverter esse quadro.

Indicador(es) proposto(s)

- Condições físico e químicas do solo;
- Diversidade taxonômica, filogenética e funcional da vegetação.
- Funções e serviços ecossistêmicos

Protocolos metodológicos

Para esse monitoramento, deverão ser avaliadas apenas as áreas que estão sendo restauradas com a metodologia de Restauração Ativa, já que as áreas de restauração passiva e assistida, onde já se constata presença de regeneração natural após 5 anos do rompimento, entrarão no monitoramento de melhoria da paisagem e no monitoramento da melhoria dos fragmentos remanescentes (detalhados na Pergunta 11). Para avaliar se a restauração ativa planejada e já implantada no domínio espacial do PG30 vai conseguir restaurar a diversidade e estrutura das comunidades vegetais, bem como o funcionamento e o provimento de serviços ecossistêmicos, serão avaliadas **60 Áreas em Restauração Ativa**, sendo **20 Áreas em Restauração Ativa sobre a faixa de depósito do rejeito** (na ADA), **20 Áreas em Restauração Ativa fora da faixa de depósito do rejeito, mas dentro da ADA** e **20 Áreas em Restauração Ativa fora da ADA**, e portanto, distante das áreas impactadas pelo rompimento da barragem. Para avaliar contaminação e danos em plantas nas áreas de restauração, bem como níveis de contaminação no solo das áreas restauradas deverão ser seguidos os protocolos metodológicos detalhados nas Perguntas 1 e 2. Para áreas em estágios iniciais de restauração em cada parcela deverão ser coletadas também amostras do estrato herbáceo e arbustivo para fins de avaliação dos níveis de contaminantes.

Das 20 áreas de restauração ativa em cada uma das 3 situações (na ADA sobre rejeito, ADA fora do rejeito e fora da ADA), **10 áreas de restauração ativa** receberão **parcelas permanentes**, para monitoramento de uma **série temporal** nos seguintes intervalos: **Tempo 1**: áreas em restauração ativa implantadas até abril de 2020, com **2 anos de idade**; **Tempo 2**: as mesmas parcelas do tempo 1, com **4 anos de idade**; **Tempo 3**: as mesmas parcelas do tempo 1, com **6 anos de idade**; **Tempo 4**: as mesmas parcelas do tempo 1, com **10 anos de idade** e **Tempo 5**: as mesmas parcelas do tempo 1, com **16 anos de idade**. As **outras 10 áreas de restauração** de cada situação receberão **parcelas não permanentes**, sorteadas aleatoriamente em cada tempo ou período de avaliação, nas áreas de restauração ativa implantadas em cada período temporal, constituindo assim uma **cronossequência**, sendo o **período 1**: áreas em restauração ativa implantadas até abril de 2020, com **2 anos de idade**; **período 2**: áreas em restauração ativa implantadas até abril de 2022, com **4 anos de idade**; **período 3**: áreas em restauração implantadas até abril de 2024, com **6 anos de idade**; **período 4**: áreas em restauração implantadas até abril de 2028, com **10 anos de idade** e **período 5**: áreas de restauração implantadas até abril de 2034, com **16 anos de idade**.

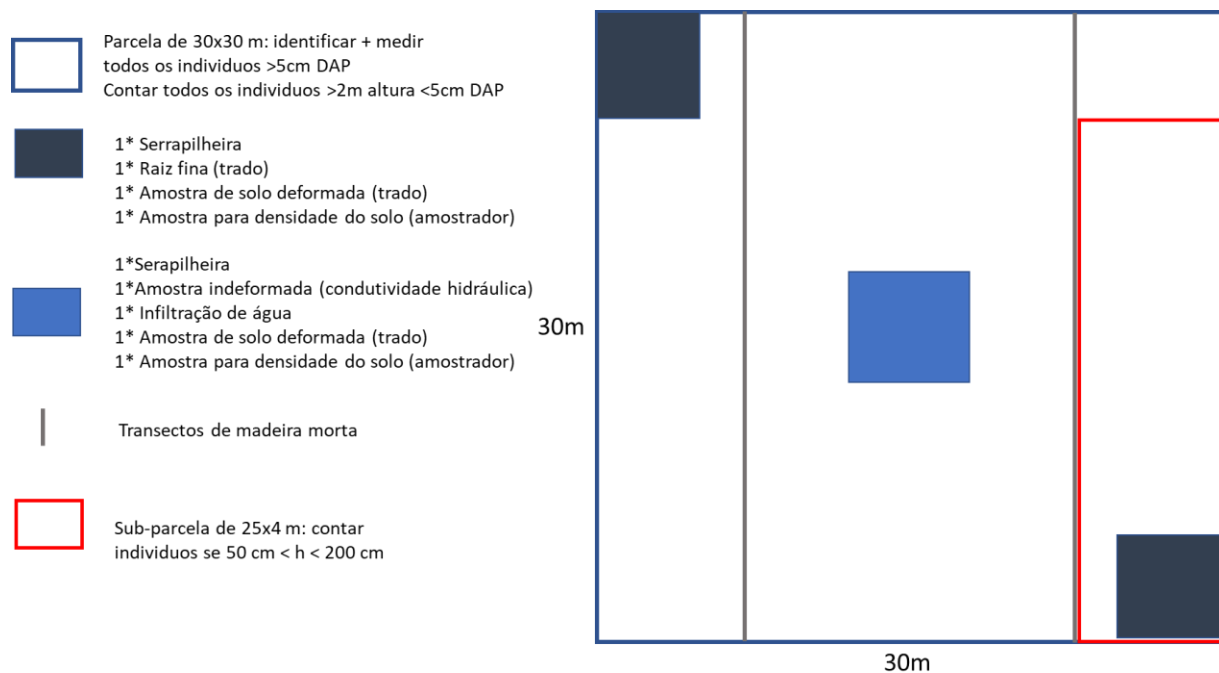
A Equipe Ekos está ciente de que as ações de restauração da Fundação Renova na bacia do rio Doce têm prazo definido para 10 anos. Da mesma forma, o Plano de Ação do PG30 tem prazo de 10 anos, com projeção de finalização para o ano de 2029. Nesse sentido, tanto o Tempo 5 das parcelas permanentes quanto o Período 5 da cronossequência estão fora do horizonte temporal de ação da Renova. Porém, a equipe entende ser fundamental avaliar os resultados das ações de restauração para além dos próximos 10 anos, uma vez que as florestas restauradas com essa idade ainda não possuem estrutura comparável às matas em estágio médio e avançado. Assim, a equipe recomenda que sejam avaliadas as alternativas para a continuidade do monitoramento da restauração após os 10 anos de ação da Fundação Renova.

Em cada uma das **60 Áreas em Restauração Ativa** será alocada uma única parcela de 30x30m, sendo **30 parcelas permanente** e **30 parcelas não permanentes** (lançadas aleatoriamente em cada tempo amostral). Além das 60 áreas de restauração ativa, serão selecionadas **20 áreas de florestas remanescentes classificadas como florestas em estágio inicial** nesse trecho da bacia, onde em cada uma delas será alocada uma parcela amostral de 30x30, somando assim 20 parcelas em **áreas de referência intermediária**. Como áreas de **referência final** serão utilizadas as mesmas áreas de referência descritas no item “definição da malha amostral” e detalhadas na Pergunta 4, sendo sorteadas **20 parcelas dentre as 60 parcelas amostrais do transecto de interior**, alocadas nos 20 fragmentos de referência fora da ADA. Cada parcela será de **30x30m cada**, distante da borda pelo menos 5m (Figura 2-3-2-1).

Para cada parcela, instalar uma estaca de cano de PVC em cada quina da parcela, utilizando a técnica de controle de ângulo e distâncias a partir dos valores de Azimute da bússola e trena (coletar o Azimute de um dos lados da parcela). As estacas devem ser fincadas firmemente ao solo com a ajuda da marreta, e quando necessário também com a escavadeira. Em cada avaliação em campo das parcelas, o limite lateral da parcela deve ser delimitado com uso de barbante amarrado às estacas, para facilitar a definição das árvores que estão dentro e fora da parcela. O barbante deve ser retirado ao fim das coletas na parcela (sugestão: no caso de APP, fazer a primeira lateral paralela e beirando o rio). Para cada avaliação as planilhas de campo devem ser digitalizadas através de fotos com a câmera fotográfica e isso deverá ser armazenado em um banco de dados construído especificamente para esse programa.

Para amostrar cada parcela nas **Áreas em Restauração**, propõe-se a metodologia de avaliação dos benefícios ambientais e do provimento de serviços ecossistêmicos de Brancalion & Rodrigues 2019, onde em cada parcela de 30x30m serão amostrados os mesmos indicadores de diversidade, de composição, de estrutura e de provimento de serviços ecossistêmicos e de acordo com os mesmos procedimentos metodológicos descritos na Pergunta 4.

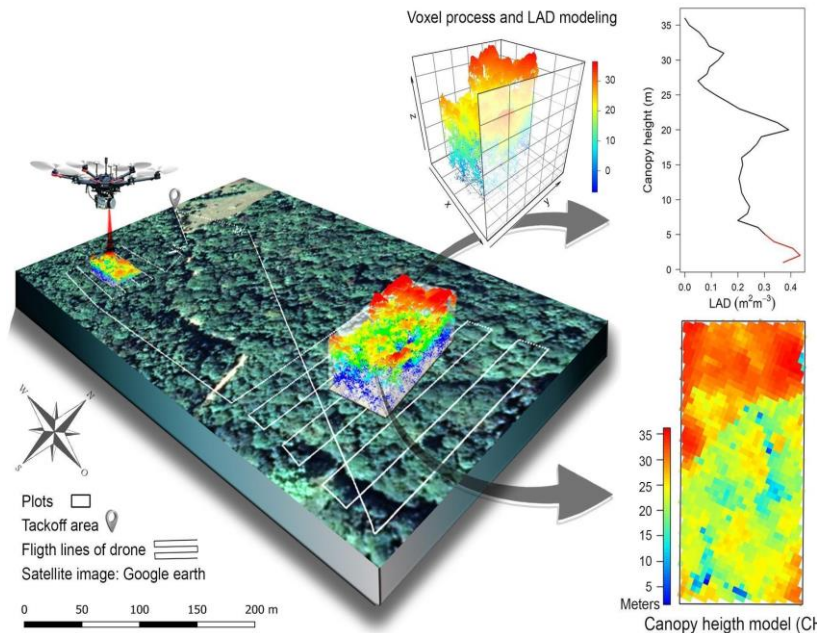
Figura 24: Esquema da parcela amostral de 30x30m nas **Áreas em Restauração**, com as subparcelas de 25x4m, as de 3x3m e os pontos de amostragem de diferentes indicadores (serapilheira, solo, infiltração de água no solo, madeira morta e raízes finas). Modificado de Brancalion et al. (2019).



Para as áreas em restauração, além do monitoramento de campo feito com as parcelas amostrais (permanentes e não permanentes), buscando ganhar escala e amostrar todas as áreas em restauração desse trecho da bacia, está sendo proposto um monitoramento usando imagens de alta resolução, de forma integrada na paisagem (Evans et al. 2018). Assim, os polígonos onde as parcelas de avaliação da multifuncionalidade estão instaladas deverá ser sobrevoado com um drone, equipado com um sensor Lidar (Phoenix Lidar VLP-16 dual-return Lidar) e um hiperspectral (Headwall Photonics Nano-Hyperspec). Serão utilizadas algumas métricas coletadas pelo sensor Lidar (ex: altura média do dossel, abertura do dossel, distribuição vertical da área foliar, rugosidade do dossel) para avaliar a estrutura das florestas e estimar sua biomassa. Serão utilizados os dados coletados com o sensor hiperspectral para estudar o potencial dessa tecnologia em avaliar o nível de diversidade do dossel (Figura 25). A forma como integrar essa tecnologia de monitoramento por imagens com os dados da parcela, p.ex. cobertura florestal, diversidade, biomassa e outros é ainda um grande desafio, mas já foi demonstrado em Pérez et al. 2019, Reis et al. 2019, De Almeida et al. 2019 e De Almeida et al. 2020.

O objetivo dessas avaliações é de gerar tecnologia eficiente para a avaliação em larga escala da multifuncionalidade das áreas em restauração na área impactada pelo rompimento da barragem.

Figura 25: Imagem ilustrativa do uso de um drone equipado com um sensor lidar para avaliar a estrutura florestal no monitoramento de áreas em restauração. Modificado de Brancalion et al. (2019).



Pergunta 13 - Quais os efeitos das ações de restauração e recuperação das áreas impactadas sobre a diversidade de invertebrados?

Contextualização

Ações de restauração eficientes conseguem, além de reestruturar a cobertura da vegetação, recompor outros atributos desse novo ecossistema, como a estrutura das comunidades de consumidores, as interações bióticas e os serviços ecossistêmicos fornecidos por esses atores (Bullock et al. 2011). Dentre os organismos terrestres, os insetos se destacam como um dos principais consumidores primários e secundários, responsáveis por diversos serviços ecossistêmicos incluindo a polinização, processamento de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (Prather et al. 2013; Roslin et al. 2017; Crespo-Pérez et al. 2020).

Ações eficientes de restauração aceleram o processo de sucessão secundária onde, além das mudanças na composição das espécies de plantas, há uma tendência geral de mudança na estrutura da vegetação (Quesada et al. 2009). O mesmo ocorre com o avanço da restauração ecológica, a qual promove mudanças graduais nas condições abióticas, estrutura e composição da vegetação (Londe et al. 2020). Alguns estudos abordaram como essas mudanças na estrutura da vegetação ao longo da sucessão secundária ou ações de restauração ecológica afetam os padrões de distribuição de diferentes grupos de insetos e suas interações (Neves et al. 2014; Alvarenga et al. 2020; Montoya-Pfeiffer et al. 2020). Esses fatores afetam o primeiro nível trófico (por exemplo, qualidade da planta) e causam efeitos em cascata para níveis tróficos mais elevados, influenciando o desempenho de insetos herbívoros, detritívoros e seus predadores (Neves et al. 2010; 2014; Silva et al. 2012; Marques et al. 2017).

Para verificar se as ações de restauração ecológica estão sendo eficientes para uma melhoria da condição inicial, o objetivo deve focar, além da recuperação da biodiversidade nestas áreas, no monitoramento do retorno das interações e funções ecológicas, bem como no potencial de melhorias na provisão de serviços ecossistêmicos associados (Montoya-Pfeiffer et al. 2020). Ambos os processos devem ser alvo dos projetos de recuperação, e o foco em apenas uma função ou serviço pode não permitir alcançar o objetivo final da recuperação (Bullock et al. 2011). Dessa forma, deve-se considerar múltiplos indicadores, desde a conservação da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos, até o desenvolvimento social e econômico (Bustamante et al. 2019). Neste sentido, associado ao programa de recuperação de áreas degradadas da bacia do rio Doce, sugere-se que seja realizado o monitoramento do retorno da fauna associada, principalmente daqueles organismos de respostas rápidas (grupos de bioindicadores de qualidade ambiental).

Hipóteses e predições

- A hipótese geral é que a restauração ambiental promova alterações na diversidade, estrutura e composição das comunidades de insetos e macrofauna edáfica.
- Espera-se aumento da riqueza e o restabelecimento de interações e funções realizadas por insetos a partir das ações de restauração ecológica.
- Espera-se que a estrutura das comunidades de insetos, os padrões de interações e as funções ecossistêmicas nas áreas de restauração sejam similares às das áreas de referência à medida que as fases de consolidação, estruturação e maturação sejam atingidas.
- Espera-se que, com o tempo, a composição de espécies de insetos e comunidades encontradas nas áreas de restauração ecológica se torne similar àquela encontrada nas áreas de referência, à medida que as áreas restauradas se aproximem do estágio de maturação.
- Espera-se que, com o tempo, a variação temporal da composição de espécies (diversidade beta temporal) e comunidades de insetos nas áreas de restauração ecológica fique similar àquela encontrada nas áreas de referência, à medida que as áreas restauradas se aproximem do estágio de maturação.

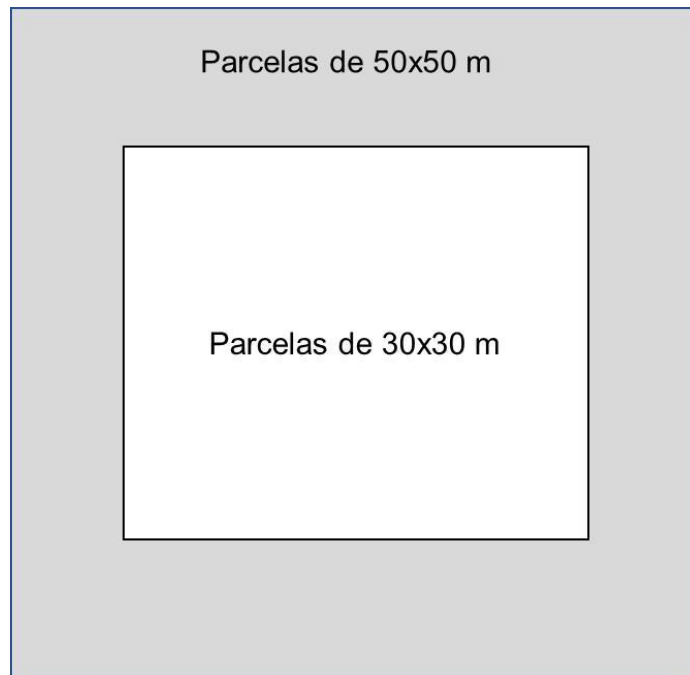
Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura e composição das comunidades de insetos terrestres.

Protocolos metodológicos

Para avaliar a eficiência do processo de restauração planejada e já implantada no domínio espacial do PG30 para restaurar a biodiversidade taxonômica, filogenética e funcional de invertebrados, serão avaliadas 60 áreas em restauração ativa, sendo 20 áreas em restauração ativa sobre a faixa de depósito do rejeito (na ADA), 20 áreas em restauração ativa fora da faixa de depósito do rejeito, mas dentro da ADA, e 20 áreas em restauração ativa fora da ADA, e portanto, distante das áreas impactadas pelo rompimento da barragem. Além das 60 áreas de restauração ativa, serão selecionadas 20 áreas de referência fora da ADA, totalizando 80 áreas de monitoramento. Em cada uma das 80 áreas será alocada uma parcela permanente, de 50x50 m, e dentro dessa parcela será inserida a parcela de 30x30 m onde parte dos indicadores serão monitorados (Figura 26).

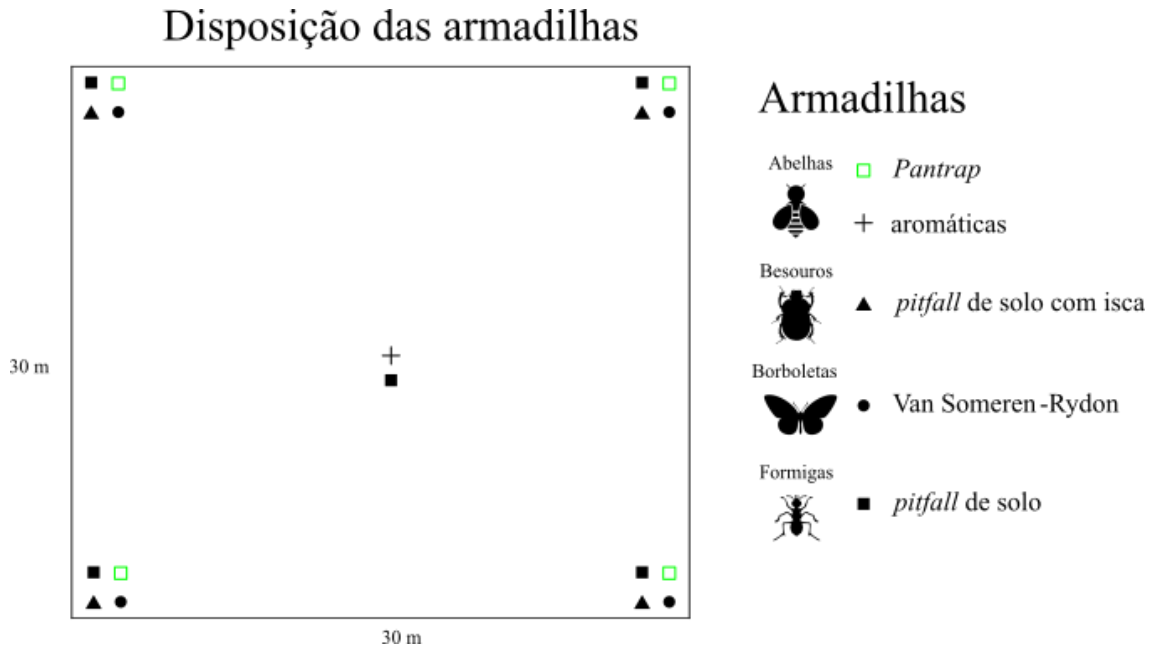
Figura 26: Representação esquemática da disposição das duas escalas de parcelas permanentes (50x50 m e 30x30 m) que devem ser utilizadas nos monitoramentos



As comunidades de insetos terrestres devem ser monitoradas por dez (10) anos, e as campanhas devem ocorrer anualmente na estação úmida (entre o início de novembro e o final fevereiro de cada ano). Tal período coincide com a maior atividade e maior ocorrência de insetos em sistemas tropicais sazonais (Johansson et al. 2020). Após dez (10) anos, avaliar a base de dados e a perspectiva dos efeitos da restauração ecológica, e avaliar a necessidade de extensão desse prazo. A Equipe Ekos está ciente de que as ações de restauração da Fundação Renova bem como o Plano de Ação do PG30 têm prazo definido para 10 anos. Porém, a equipe entende que pode ser necessário continuar o monitoramento da comunidade de insetos para além dos próximos 10 anos, uma vez que as florestas restauradas com essa idade ainda não possuem estrutura comparável às matas em estágio médio e avançado. Assim, a equipe recomenda que sejam avaliadas as alternativas para a continuidade do monitoramento da restauração após os 10 anos de ação da Fundação Renova.

Os procedimentos descritos abaixo são referentes a uma unidade amostral e devem ser repetidos em todas as 80 parcelas permanentes, seguindo a descrição apontada na Figura 27. As amostragens dos taxa sugeridos, interações e serviços ecológicos (Pergunta 16) não devem ser realizadas simultaneamente na mesma parcela, para evitar a interferência na atratividade das armadilhas e/ou da movimentação de pesquisadores nas amostragens.

Figura 27: Representação esquemática da disposição dos métodos de amostragem de insetos nas unidades amostrais (parcelas de 30x30 m).



Amostragem de Insetos

Abelhas (Hymenoptera):

Para a amostragem de abelhas serão utilizadas duas técnicas complementares, armadilhas do tipo *Pantrap* e armadilhas aromáticas (Alvarenga et al. 2020). Em cada unidade amostral (parcela 30x30 m) serão dispostas quatro conjuntos de armadilhas do tipo *Pantrap* nos vértices da parcela, e um kit de armadilhas aromáticas no centro da parcela (ver Figura 27).

As armadilhas do tipo *Pantrap* consistem de potes pintados com cores no espectro que esses insetos enxergam - o ultravioleta - preenchidos com água com sal e sabão (Popic et al. 2013). Cada conjunto de armadilhas *Pantrap* é composto por três pratos, sendo um amarelo, um azul e um branco. Os pratos ficam dispostos em hastes fixadas em forma de triângulo equilátero, com distância entre hastes de 50 cm uma da outra. Cada armadilha deve ser fixada com a utilização de um arame galvanizado e de binder clips e deve ser inserida uma solução salina (150 mL). Após 24h, as armadilhas devem ser vistoriadas, e todos os indivíduos amostrados devem ser transferidos para um tubo tipo *Falcon* utilizando uma pinça entomológica. Nesse tubo deve ser inserido a etiqueta contendo identificação da amostra, com dados de data, número da parcela, número da área de restauração ou referência e coletor (es). Inserir no tubo *Falcon* um volume de álcool absoluto (o suficiente para as abelhas não ficarem secas quando o tubo estiver deitado). Após 24 h (totalizando 48 h) o procedimento deve ser repetido. Finalmente as armadilhas devem ser recolhidas.

As armadilhas aromáticas são garrafas pet contendo compostos aromáticos e orifícios que permitem o acesso das abelhas a esses compostos. Essa técnica foi desenvolvida para a coleta de insetos conhecidos como

abelhas das orquídeas (*Euglossina*) (ver Campos et al. 1989). O kit de essências (iscas) aromáticas para a coleta de abelhas da subtribo *Euglossina* consiste em oito compostos químicos diferentes (acetato de benzila, cinamato de metila, cineol (eucalipitol), escatol, eugenol, salicilato de metila, vanilina e β -ionona) comumente utilizados para amostragem dos machos dessas abelhas (ver Nemésio & Santos Júnior 2014). Cada kit de oito garrafas pet deve conter as oito essências/iscas. Cada essência é inserida em tubos *Eppendorf* contendo o algodão e inseridos dentro de garrafas pet. Posteriormente em cada garrafa deve ser inserido um volume de solução salina (200 mL). O tubo *Eppendorf* (contendo uma das essências) deve ser inserido dentro da armadilha aromática, preso ao barbante próximo da tampa da garrafa. A outra extremidade desse barbante é utilizado para amarrar a armadilha na vegetação a cerca de 1,5 m do chão, sendo a distância entre as armadilhas de aproximadamente 50 cm. Cada armadilha deve ser rotulada (e.g., isca cinamato de metila, isca eugenol, etc). Após 24 h as armadilhas devem ser vistoriadas, e todos os indivíduos amostrados devem ser transferidos para um tubo *Falcon* utilizando uma bandeja e uma pinça entomológica. Nesse tubo deve ser inserido a etiqueta contendo identificação da amostra, com dados de data, isca, número da parcela, número da área de restauração ou referência e coletor (es). Inserir no tubo *Falcon* um volume de álcool absoluto (o suficiente para as abelhas não ficarem secas quando o tubo estiver deitado). Posteriormente, caso necessário, os volumes das essências e da solução salina de cada garrafa deve completados. Após 24 h (totalizando 48 h) o procedimento deve ser repetido. Finalmente as armadilhas devem ser recolhidas.

Para a triagem, o material amostrado deve ser transferido para uma placa contendo álcool absoluto e deixar por 15 min e posteriormente deixar escorrer o excesso em papel absorvente, com cuidado para manter a identificação. As abelhas devem ser montadas em triângulos ou diretamente em alfinetes entomológicos tamanho 00 ou 01. Para a fixação dos triângulos ou das abelhas nos alfinetes entomológicos é necessária uma folha de isopor de alta densidade. De cada uma dessas amostras, um indivíduo de cada espécie coletada deverá ser montado e o restante será armazenado em mantas entomológicas. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, isca, número da parcela, número da área de restauração ou referência, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Ao final do processo as abelhas fixadas nos alfinetes/triângulos, devem ser colocadas em uma estufa a 40°C, por 24 a 48 horas. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora.

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de abelhas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies por parcela em cada período amostral.

Besouros escarabaeíneos (Coleoptera, Scarabaeinae):

Para a amostragem de besouros escarabaeíneos serão utilizadas armadilhas de queda do tipo *pitfall* de solo (Neves et al. 2010). Em cada unidade amostral (parcela) serão dispostas quatro armadilhas do tipo *pitfall* nos vértices da parcela de 30x30 m (ver Figura 27). A armadilha do tipo *pitfall* consiste em pote de 1L, enterrado ao nível do solo, com água e detergente. Utilizando uma cavadeira (boca de lobo) e a pá pequena de jardinagem, enterrar o pote plástico de 1L, com a tampa, até nivelar sua abertura no nível do solo. Após enterrar o pote plástico, retirar a sua tampa e inserir a identificação da armadilha, que consiste em uma etiqueta com dados sobre o número da coleta, o número do *pitfall*, identificação da parcela e da área de restauração ou referência. Preencher cada recipiente (armadilha) com 250 ml de líquido conservante (mistura de água, 5 g de sal e 5 ml

de detergente neutro). Acomodar a isca em cada armadilha: um recipiente plástico de 4 cm de altura e 5 cm de diâmetro (copo plástico de 50 ml) é transpassado por um arame fino e maleável (20 cm de comprimento) na sua borda superior e colocado sobre a armadilha, servindo como porta-isca; adicionar ca. 20 g de isca ao recipiente porta-isca. Como isca será utilizado fezes de porco e fezes humanas, sendo 4 partes de fezes de porco para 1 parte de fezes humanas. Após a instalação da armadilha, montar uma cobertura contra chuva sobre a abertura do *pitfall*, usando um palito de churrasco partido em três partes e servindo como suporte para um prato de plástico. As armadilhas devem permanecer instaladas por dois dias (48 h), posteriormente as armadilhas serão retiradas, o material coletado é transferido para um recipiente plástico (150 ml), utilizando uma peneira de malha fina e uma pinça entomológica, colocando sobre a peneira um tecido do tipo voal (15 cm × 15 cm). Após a transferência, preencher os recipientes plásticos com amostras com álcool absoluto o suficiente para os escarabeíneos não fiquem secos.

Para a triagem o material amostrado deve ser transferido para uma placa de Petri contendo álcool absoluto, e deve ser deixado por 15 min. Os espécimes devem ficar submersos pelo álcool. Posteriormente, colocar os espécimes para secar em papel absorvente em uma bandeja ou placa de Petri. Os escarabeíneos amostrados devem ser montados em triângulos ou diretamente em alfinetes entomológicos. Para a fixação dos triângulos ou dos escarabeíneos nos alfinetes entomológicos é necessária uma folha de isopor de alta densidade. Papel absorvente seco deve ser preso com alfinetes sobre o isopor. Ao final do processo, os escarabeíneos fixados nos alfinetes/triângulos devem ser colocados em estufa a 60°C por 48 h para a secagem sobre um isopor. De cada uma dessas amostras, um indivíduo de cada espécie coletada deverá ser montado e o restante será armazenado em mantas entomológicas. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, número da parcela, número da área em restauração ou referência, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora.

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de besouros escarabeíneos serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies e a abundância de indivíduos por parcela em cada período amostral.

Borboletas frugívoras (Lepidoptera, Nymphalidae):

Para a amostragem de borboletas frugívoras serão utilizadas armadilhas do tipo Van Someren-Rydon (VSR) (DeVries 1987, Beirão et al. 2017). Em cada unidade amostral (parcela) serão dispostas quatro armadilhas nos vértices da parcela de 30x30m (Figura 27). As armadilhas seguem as modificadas e adaptações realizadas por Freitas et al. (2014), de acordo com o padrão e dimensões preconizados pela RedeLep do ICMBio (Rede Nacional de Pesquisa e Conservação dos Lepidópteros). Cada armadilha é composta por um cilindro de 80-100 cm de comprimento por 35-40 cm de diâmetro, com a parte superior coberta com plástico para evitar encharcamento da isca e das borboletas. Em cada armadilha será adicionado 10 mL de isca atrativa de macerado de banana fermentada por pelo menos 48 h. A isca será disposta em recipiente plástico no centro da armadilha e estas serão alocadas em campo a uma altura de aproximadamente 1.0 m do solo e, seguindo o proposto por Uehara-Prado et al. (2010), permanecerão em campo por 3 dias consecutivos (até 72 h), com revisões das armadilhas em intervalos de 24h para remoção dos espécimes aprisionados.

Os espécimes coletados nas armadilhas deverão ser removidos em campo, sacrificados pela compressão do tórax, e acondicionados em envelopes entomológicos de papel vegetal identificados com data, armadilha, parcela e área em restauração ou referência. No laboratório, as borboletas devem ser montadas em esticador de asas entomológico com auxílio de papel vegetal e alfinetes entomológicos 00 ou 01 (37-38 mm), e posteriormente secas e acondicionadas em coleção entomológica para preservação dos espécimes. Após a montagem, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, número da parcela, número da área em restauração ou referência, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou cânfora. A identificação será feita através de guias, consultas à especialistas e coleções de referência.

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de borboletas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies e a abundância de indivíduos por parcela em cada período amostral.

Formigas (Hymenoptera, Formicidae):

Para a amostragem de formigas epigéicas, em cada unidade amostral (parcela) serão dispostas cinco armadilhas de queda do tipo *pitfall* de solo (Marques et al. 2017). As armadilhas serão dispostas nos vértices e no centro da parcela de 30x30m (Figura 2). A armadilha do tipo *pitfall* consiste em pote de 1 L, enterrado ao nível do solo, contendo água e detergente. Utilizando uma cavadeira (boca de lobo) e a pá pequena de jardinagem, enterrar o pote plástico de 1 L, com a tampa, até nivelar sua abertura no nível do solo. Após enterrar o pote plástico, retirar a sua tampa e inserir a identificação da armadilha, que consiste em uma etiqueta de papel vegetal com dados sobre o número da coleta, o número do *pitfall*, identificação da parcela e da área de restauração ou referência. Após a instalação da armadilha, montar uma cobertura contra chuva sobre a abertura do *pitfall*, usando um palito de churrasco partido em três partes e servindo como suporte para um prato de plástico. As armadilhas devem permanecer instaladas por dois dias (48 h), posteriormente as armadilhas serão retiradas e o material coletado é triado. Este método de amostragem de formigas é frequentemente utilizado e apontado como um dos mais eficientes na captura de um grande número de espécimes (Gadagkar et al. 2000). É utilizado para estimar a riqueza e composição de formigas com atividade na superfície uma vez que integra tanto atributos de forrageamento no solo quanto padrões de dispersão das colônias (Bestelmeyer et al. 2000).

Após a triagem, a montagem das formigas é feita com alfinetes, cola branca e triângulos entomológicos (feitos com um cortador de triângulos entomológicos) em isopor de alta densidade. De cada uma dessas amostras, um indivíduo de cada espécie coletada deverá ser montado em alfinete entomológico inoxidável e o restante será armazenado em novos frascos em meio líquido (álcool 70%). Depois de coladas no triângulo com cola branca, os indivíduos devem ser secos em estufa (ca. 37°C), por 24 ou 48 h. Logo abaixo do triângulo com a formiga, devem ser inseridas as etiquetas de identificação da amostra, com dados de data, número da parcela, número da área de restauração ou referência, coletor (es), cidade, estado, país de coleta e uma outra etiqueta com sua identidade taxonômica. Para evitar fungos e outros organismos que danificam a coleção, é importante adicionar naftalina e/ou óleo de cravo ou cânfora. Após a montagem dos espécimes, a identificação será devera ser realizada através de guias, consultas à especialistas e coleções de referência (ex. Baccaro et al. 2015, Souza et al. 2016).

Como métricas para as análises da estrutura de comunidades de formigas serão utilizadas a riqueza e composição de espécies/morfoespécies por parcela em cada período amostral.

Pergunta 14 - Como o processo de recuperação e restauração ecológica de habitats afeta a composição da comunidade de anfíbios e répteis Squamata ao longo do tempo?

Contextualização:

As alterações físicas decorrentes do rompimento de Fundão decorreram da liberação de rejeitos e água que resultaram em um grande fluxo desses materiais ao longo da drenagem localizada a jusante da barragem. A passagem da onda de lama resultou em grandes alterações em habitats aquáticos (i.e. lagoas e riachos) utilizados para a reprodução de anfíbios. Lagoas, poças e brejos foram total ou parcialmente soterradas, especialmente no trecho próximo à Fundão, onde houve deposição de material. Por outro lado, novas coleções de água parada se formaram sobre o rejeito depositado. Riachos tiveram calha e margens descaracterizadas e vegetação ripária suprimida.

Em habitats terrestres, a passagem da onda de lama, além de ocasionar a supressão de extensas áreas de vegetação florestal nativa, promoveu, nos locais onde houve deposição de material (trecho até UHE Risoleta Neves), alterações do horizonte superficial de solo, com substituição de solos naturais por rejeitos, normalmente mais finos e inférteis que os materiais naturais.

Diferentes estratégias de recuperação do ambiente físico e restauração ecológica de áreas degradadas têm sido aplicadas na área diretamente afetada pelo rejeito. No ambiente aquático, a calha e margens de riachos foram reconformadas por meio de enrocamentos. Em ambientes terrestres, a restauração da vegetação vem ocorrendo de maneira passiva ou assistida. Entretanto, passados mais de cinco anos do rompimento, a recolonização da comunidade de anfíbios e répteis nesses ambientes ainda não foi avaliada, tampouco a sua mudança ao longo do tempo.

É provável que imediatamente após o rompimento poucas ou nenhuma espécie da herpetofauna tenham permanecido em ambientes aquáticos e terrestres intensamente impactados (i.e. com vegetação totalmente suprimida). Entretanto, é esperado que algumas poucas espécies, comuns de área aberta e frequentemente associadas a ambientes alterados, tenham iniciado a reocupação desses habitats e que, com o tempo, no médio-longo prazo, essas sejam gradativamente substituídas por espécies menos comuns e associadas a ambientes florestais.

Hipóteses e predições

- Trechos de riachos que deságuam no córrego Santarém e rio Gualaxo do Norte que foram diretamente afetados pelo rejeito voltaram a ser utilizados por anfíbios. Hipotetiza-se que a diversidade (riqueza e composição) da comunidade seja diferente dos riachos de referência, mas que, com o passar do tempo, se a recuperação estiver sendo eficaz, haverá recolonização destes riachos. Ainda, trechos com enrocamento deverão ter um processo de recuperação distinto dos trechos com regeneração sem enrocamentos.

- A restauração ecológica modifica a composição da comunidade de anfíbios de lagoas soterradas pelo rejeito ao longo do tempo. Espera-se que lagoas em processo de restauração estejam sendo utilizadas por espécie de anfíbios diferentes daquelas encontradas em lagoas de referência.
- Espera-se ainda que, com o tempo, a composição de espécies em lagoas em processo de restauração se aproxime daquela presente em áreas de referência.
- A restauração ecológica afeta a composição da comunidade de anfíbios e répteis terrestres ao longo do tempo. Espera-se que áreas em processo de restauração estejam sendo utilizadas por espécie de anfíbios e répteis diferentes daquelas encontradas em áreas de referência.
- Espera-se ainda que, com o tempo, a composição de espécies nas áreas em processo de restauração se aproxime daquela presente em áreas de referência, com uma substituição de espécies de área aberta por espécies de borda de mata ou florestais de serapilheira.

Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura e composição das comunidades de anfíbios e répteis squamata.

Protocolo metodológico

Hipótese/pergunta específica: Os trechos de riachos que desaguam no córrego Santarém e rio Gualaxo do Norte que foram diretamente afetados pelo rejeito e que estão em processo de restauração ou recuperação estão sendo utilizados por anfíbios? Em caso positivo, como a composição da comunidade de anfíbios desses trechos difere de trechos referência e como isso varia ao longo do tempo?

Para verificar os efeitos da restauração/recuperação de riachos na composição da comunidade de anfíbios, deverão ser amostrados 30 trechos de riachos permanentes, sendo 10 localizados na ADA, mas que não sofreram intervenções em seu leito e margem, ou seja, que estão em restauração espontânea, 10 também localizados na ADA, entretanto que tiveram calhas ou margens recuperadas por intervenções artificiais (idealmente com erocamento) e 10 não afetados, localizados a mais de 500 metros da ADA em meio a fragmentos florestais (referência).

As amostragens deverão ocorrer anualmente, durante 10 anos. A cada ano cada trecho de riacho será amostrado 3 vezes, durante a estação chuvosa. O intervalo temporal entre amostragens deve ser de no mínimo 10 dias e ocorrer em novembro, dezembro e janeiro, quando a maior parte das espécies de anfíbios encontra-se em atividade. As amostragens ocorrerão entre 19:00 (ou após o anoitecer) e 24:00h. O esforço amostral será limitado por tempo. Cada trecho de riacho deverá ter 150 metros de extensão e será percorrido lentamente (cerca de 150 m/h), a pé, por um observador. Dessa maneira, cada trecho será percorrido em 60 minutos. A ocorrência das espécies será verificada por meio da visualização de adultos, jovens e girinos, além do registro da vocalização das espécies. A abundância será avaliada com base apenas no número de adultos/jovens visualizados e em atividade de vocalização. Imagos e girinos não serão contabilizados para avaliação de abundância.

A partir de um mapeamento visual, utilizando-se imagens de satélite de 26/07/2016 (Google Earth), foram identificados 61 riachos que constituem potenciais unidades amostrais, sendo 21 em processo de restauração espontânea, 16 que tiveram calhas e margens recuperadas e 24 trechos referência (Tabela 13, Figura 28, Anexo 9). Entretanto, esses riachos deverão ser inspecionados e validados em campo, em etapa prévia a amostragem. Durante a inspeção devem ser verificadas características que os riachos precisam ter e que nem

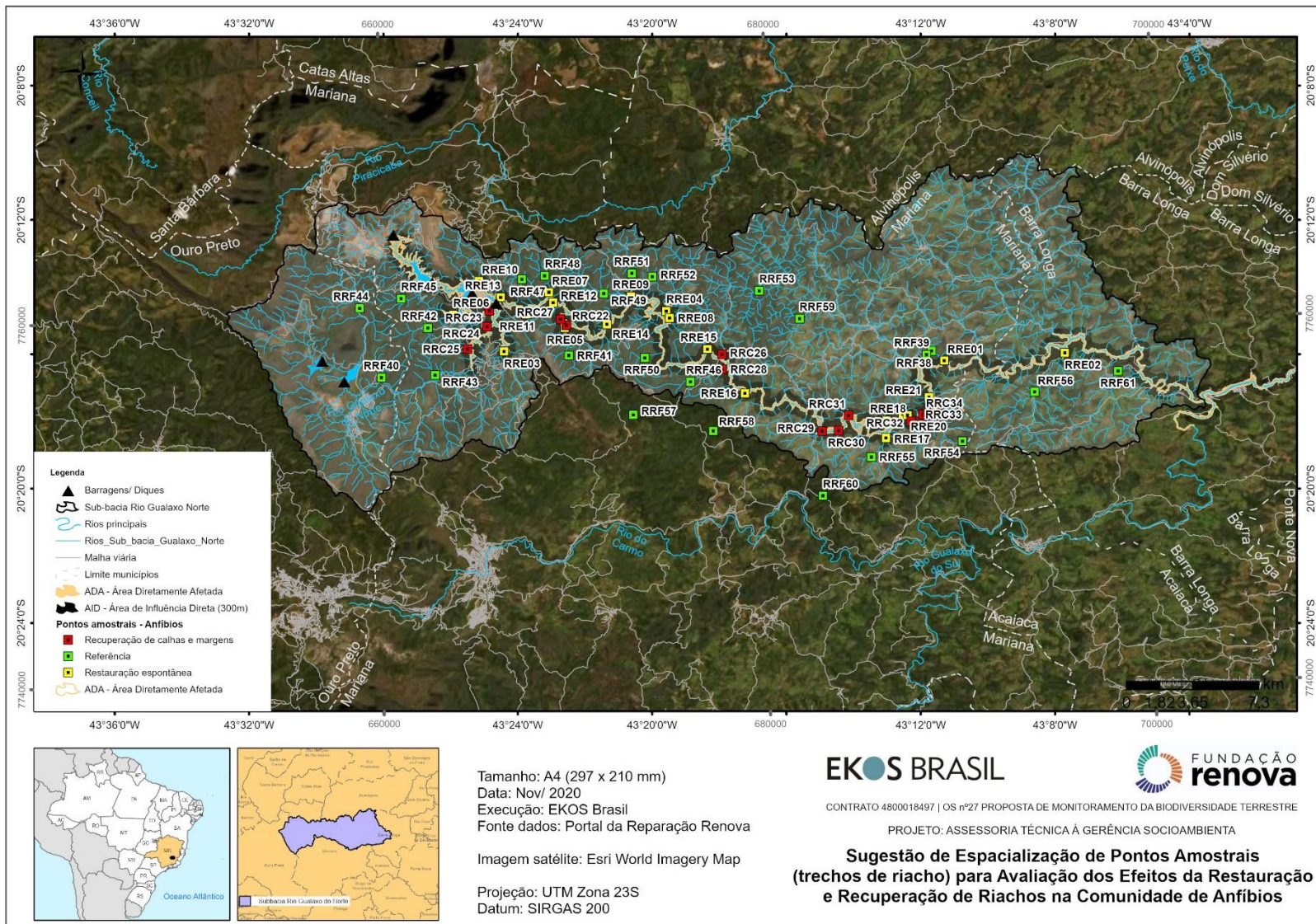
sempre podem ser determinadas com precisão por meio de imagens de satélite. É preciso certificar que os riachos sejam permanentes e verificar se sofreram ou não algum tipo de intervenção em suas calhas e margens (e.g. reconformação, enrocamento). Os transectos (dentro ou marginais aos tributários) deverão ser abertos e marcados durante esta etapa. Ainda, restrições relacionadas ao acesso e permissão dos proprietários deverão ser avaliadas previamente ao início das amostragens.

Tabela 13: Potenciais pontos amostrais (trechos de riacho) sugeridos para a avaliação dos efeitos da restauração espontânea e recuperação de riachos diretamente afetados na estrutura da comunidade de anfíbios.

Riacho	Coordenadas UTM 23K		Categoria
RRE01	689206	7757623	restauração espontânea
RRE02	695463	7757985	restauração espontânea
RRE03	666391	7758360	restauração espontânea
RRE04	674823	7760491	restauração espontânea
RRE05	669554	7759628	restauração espontânea
RRE06	663772	7760400	restauração espontânea
RRE07	668747	7761590	restauração espontânea
RRE08	674992	7760111	restauração espontânea
RRE09	672993	7761318	restauração espontânea
RRE10	665125	7762237	restauração espontânea
RRE11	667555	7760390	restauração espontânea
RRE12	668968	7761019	restauração espontânea
RRE13	666249	7761332	restauração espontânea
RRE14	671736	7759799	restauração espontânea
RRE15	676937	7758380	restauração espontânea
RRE16	678855	7755937	restauração espontânea
RRE17	686140	7753409	restauração espontânea
RRE18	686180	7754358	restauração espontânea
RRE19	687031	7754699	restauração espontânea
RRE20	687271	7754652	restauração espontânea
RRE21	688392	7755622	restauração espontânea
RRC22	669638	7759762	Recuperação de calhas e margens
RRC23	665647	7760603	Recuperação de calhas e margens
RRC24	665520	7759735	Recuperação de calhas e margens
RRC25	664495	7758508	Recuperação de calhas e margens
RRC26	677687	7758089	Recuperação de calhas e margens
RRC27	669339	7760105	Recuperação de calhas e margens
RRC28	677697	7757266	Recuperação de calhas e margens
RRC29	682832	7753822	Recuperação de calhas e margens
RRC30	683690	7753838	Recuperação de calhas e margens
RRC31	684215	7754670	Recuperação de calhas e margens
RRC32	687445	7754302	Recuperação de calhas e margens

Riacho	Coordenadas UTM 23K		Categoria
RRC33	687886	7754146	Recuperação de calhas e margens
RRC34	688072	7754679	Recuperação de calhas e margens
RRC35	688283	7754588	Recuperação de calhas e margens
RRC36	688476	7754643	Recuperação de calhas e margens
RRC37	688713	7754979	Recuperação de calhas e margens
RRF38	688556	7758162	referência
RRF39	688289	7757956	referência
RRF40	660017	7756982	referência
RRF41	669747	7758106	referência
RRF42	662455	7759686	referência
RRF43	662806	7757095	referência
RRF44	658926	7760804	referência
RRF45	661076	7761315	referência
RRF46	676037	7756594	referência
RRF47	667354	7762312	referência
RRF48	668535	7762497	referência
RRF49	671586	7761492	referência
RRF50	673685	7757933	referência
RRF51	673058	7762587	referência
RRF52	674117	7762392	referência
RRF53	679653	7761559	referência
RRF54	690106	7753188	referência
RRF55	685373	7752369	referência
RRF56	693873	7755856	referência
RRF57	673054	7754814	referência
RRF58	677192	7753882	referência
RRF59	681730	7760005	referência
RRF60	682840	7750266	referência
RRF61	698210	7756955	referência

Figura 28: Localização dos potenciais pontos amostrais (trechos de riacho) sugeridos para a avaliação dos efeitos da restauração espontânea e recuperação de riachos diretamente afetados na estrutura da comunidade de anfíbios.



Hipótese/pergunta específica: Como o processo de restauração espontânea afeta a composição da comunidade de anfíbios de lagoas soterradas pelo rejeito ao longo do tempo?

Para avaliar os efeitos do processo de restauração espontânea na composição da comunidade de anfíbios de lagoas soterradas pelo rejeito, serão avaliadas 30 lagoas ou brejos, sendo 10 localizadas na ADA, mas que não sofreram intervenções artificiais, ou seja, que estão em restauração espontânea, 10 localizadas na sub-bacia do Gualaxo do Norte, mas fora de um *buffer* de 500 m da ADA (referência) e 10 localizadas na sub-bacia do Piracicaba, próximas à calha do rio Piracicaba (referência). Cada lagoa deve distanciar pelo menos 500 m uma da outra.

As amostragens deverão ocorrer a anualmente durante 10 anos. A cada ano, cada lagoa será amostrada 3 vezes, durante a estação chuvosa. O intervalo temporal entre amostragens deve ser de no mínimo 10 dias e ocorrer em novembro, dezembro e janeiro, quando a maior parte das espécies de anfíbios encontra-se em atividade.

As amostragens serão realizadas no período noturno (entre 18:30 e as 24:00h). O esforço amostral será limitado por tempo. Cada lagoa será amostrada durante 60 minutos, por um observador que percorrerá a pé, lentamente, uma trilha previamente aberta na margem do corpo d'água. A ocorrência das espécies será verificada por meio de adultos e jovens visualizados ou em atividade de vocalização.

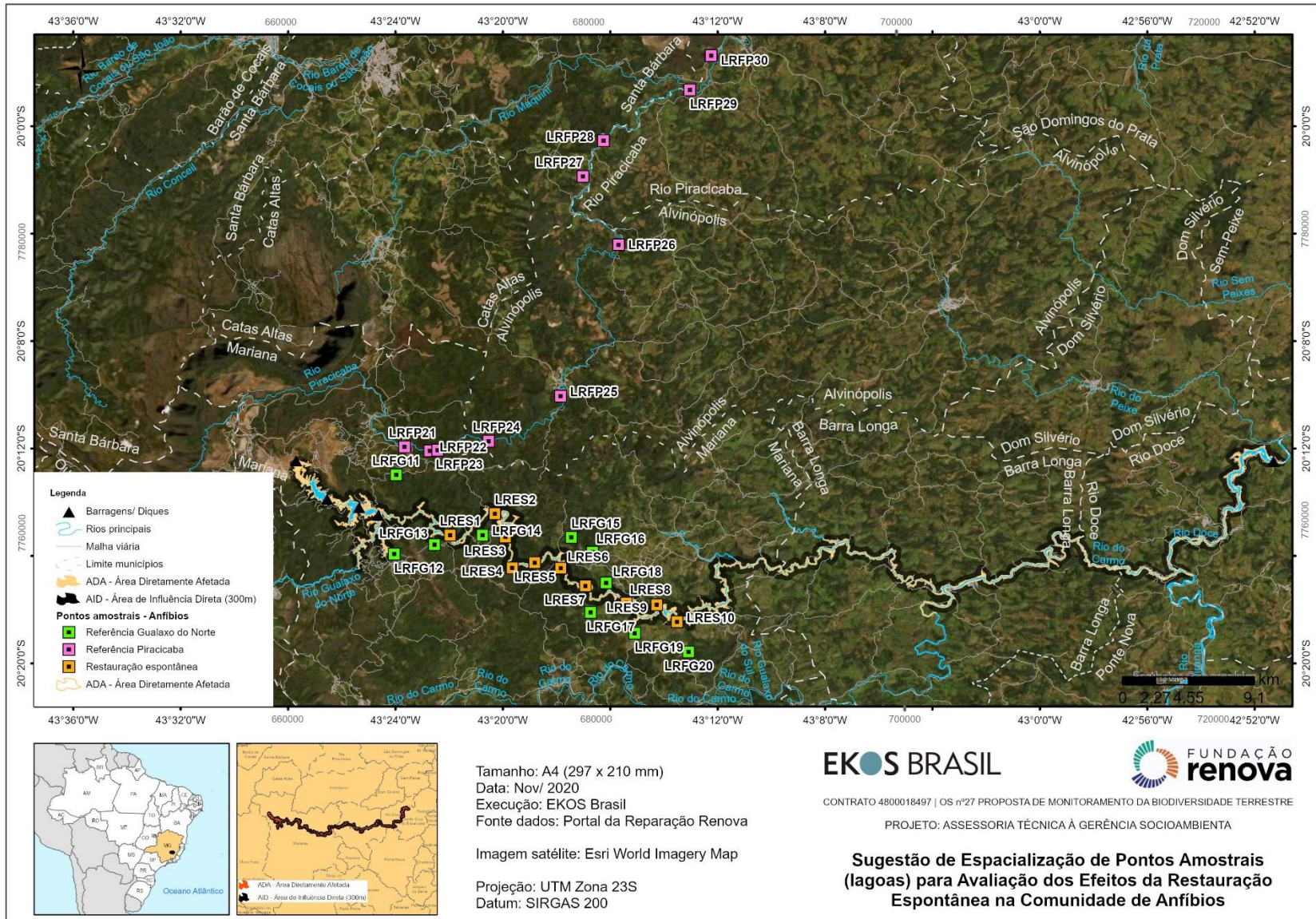
A partir de um mapeamento visual, utilizando-se imagens de satélite de 2020 (Google Earth), foram identificadas 30 lagoas/brejos que constituem potenciais unidades amostrais (Tabela 14, Figura 29, Anexo 10). Entretanto, essas lagoas deverão ser inspecionadas e validadas em campo, em etapa prévia a amostragem. As trilhas marginais que serão utilizadas para amostragem deverão ser abertas e marcadas durante esta etapa. Deverão ser evitadas lagoas que tenham como finalidade principal a piscicultura ou que sejam bebedouros de gado localizados no meio do pasto e totalmente desprovidos de vegetação emersa ou marginal, já que esses ambientes tendem apresentar comunidades de anfíbios muito empobrecidas. Ainda, restrições relacionadas ao acesso e permissão dos proprietários deverão ser avaliadas previamente ao início das amostragens.

Tabela 14: Pontos amostrais (lagoas) selecionadas para a avaliação dos efeitos da restauração espontânea de lagoas diretamente afetadas na estrutura da comunidade de anfíbios.

Lagoa	Coordenadas UTM 23K		Categoria
LRES1	670656	7759597	restauração espontânea
LRES2	673572	7761034	restauração espontânea
LRES3	674238	7759438	restauração espontânea
LRES4	674659	7757301	restauração espontânea
LRES5	676118	7757644	restauração espontânea
LRES6	677811	7757255	restauração espontânea
LRES7	679392	7756024	restauração espontânea
LRES8	682024	7754814	restauração espontânea
LRES9	684001	7754674	restauração espontânea
LRES10	685307	7753490	restauração espontânea

Lagoa	Coordenadas UTM 23K		Categoria
LRFG11	667198	7763770	referência Gualaxo do Norte
LRFG12	667017	7758333	referência Gualaxo do Norte
LRFG13	669640	7758955	referência Gualaxo do Norte
LRFG14	672753	7759569	referência Gualaxo do Norte
LRFG15	678512	7759360	referência Gualaxo do Norte
LRFG16	679873	7758337	referência Gualaxo do Norte
LRFG17	679709	7754195	referência Gualaxo do Norte
LRFG18	680738	7756210	referência Gualaxo do Norte
LRFG19	682556	7752735	referência Gualaxo do Norte
LRFG20	686033	7751417	referência Gualaxo do Norte
LRFP21	667758	7765688	referência Piracicaba
LRFP22	669398	7765394	referência Piracicaba
LRFP23	669903	7765439	referência Piracicaba
LRFP24	673218	7766029	referência Piracicaba
LRFP25	677918	7769067	referência Piracicaba
LRFP26	681786	7779433	referência Piracicaba
LRFP27	679523	7784153	referência Piracicaba
LRFP28	680882	7786597	referência Piracicaba
LRFP29	686529	7790024	referência Piracicaba
LRFP30	687943	7792364	referência Piracicaba

Figura 29: Localização dos pontos amostrais (lagoas) selecionadas para a avaliação dos efeitos da restauração espontânea de lagoas diretamente afetadas na estrutura da comunidade de anfíbios.



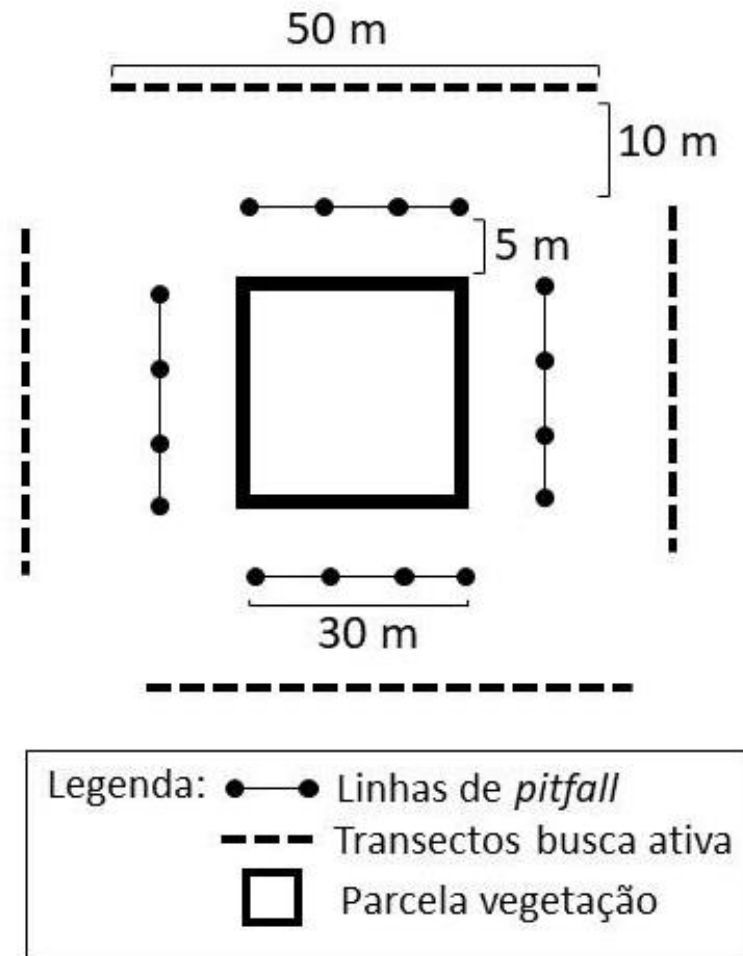
Hipótese/pergunta específica: Como a restauração ecológica afeta a composição da comunidade de anfíbios e répteis terrestres ao longo do tempo?

Para avaliar os efeitos do processo de restauração sobre a composição da comunidade de anfíbios e répteis terrestres ao longo do tempo, serão avaliadas 30 áreas em restauração ativa, sendo 10 sobre a faixa de depósito do rejeito (na ADA), 10 fora da faixa de depósito do rejeito, mas dentro da ADA, 10 fora da ADA. As 30 áreas receberão parcelas permanentes, coincidentes espacialmente com as parcelas permanentes para o monitoramento da restauração da vegetação. Além das 30 áreas de restauração ativa, serão selecionadas 10 áreas de florestas remanescentes classificadas como florestas em estágio avançado (referência final). As amostragens serão realizadas anualmente durante 10 anos, porém, ao final do nono ano deverá ser avaliada a possibilidade de continuidade do monitoramento. A Equipe Ekos está ciente de que as ações de restauração da Fundação Renova bem como o Plano de Ação do PG30 têm prazo definido para 10 anos. Porém, a equipe entende que pode ser necessário continuar o monitoramento da comunidade anfíbios e répteis para além dos próximos 10 anos, uma vez que as florestas restauradas com essa idade ainda não possuem estrutura comparável às matas em estágio médio e avançado. Assim, a equipe recomenda que sejam avaliadas as alternativas para a continuidade do monitoramento da restauração após os 10 anos de ação da Fundação Renova. A cada intervalo temporal, durante a estação chuvosa, cada área será amostrada entre novembro a janeiro, quando a maior parte das espécies da herpetofauna encontra-se em atividade. É importante garantir que a amostragem da herpetofauna não se sobreponha temporalmente à de outros grupos da fauna e flora.

Serão utilizados dois métodos de amostragens: busca ativa diurna/noturna e armadilhas de intercepção e queda do tipo *pitfall*. Em cada área serão utilizados 16 *pitfalls* dispostos em 4 linhas de 4 *pitfalls*, cada, formando um quadrado ao redor da parcela de 30 x 30 m de monitoramento da vegetação. O espaçamento entre *pitfalls* na linha deve ser de 10 m. As linhas de *pitfalls* devem estar distantes 30 metros da borda externa da parcela (Figura 30). Em cada campanha, as armadilhas deverão ficar abertas por 5 dias (120 horas), totalizando 1920 horas-armadilha por campanha e 5760 horas-armadilha por estação chuvosa. As armadilhas deverão ser checadas diariamente, pela manhã. Os indivíduos capturados devem ser identificados, acondicionados em sacos plásticos e soltos dentro do mesmo fragmento, de preferência a mais de 200 metros das armadilhas.

A busca ativa ocorrerá em quatro transectos de 50 m de comprimento por 5 m de largura, dispostos paralelamente a cada um dos lados da parcela de 30 x 30 m de monitoramento da vegetação. Os transectos devem estar distantes 15 m da borda externa da parcela e 10 m das linhas de *pitfalls* (Figura 3). As amostragens diurnas devem ocorrer entre 9:00 e 16:00 h e as noturnas entre 19:00 e 24:00 h. Cada transecto deve ser percorrido um vez por campanha, por uma pessoa, a pé, lentamente (100 m/h), em 30 minutos, sendo, portanto, necessária uma duas horas para amostrar cada área. Dessa maneira, o esforço dispendido por área, por turno (diurno/noturno), será de 2 horas-pessoa, por campanha e de 6 horas-pessoa, por estação chuvosa. A ocorrência das espécies será verificada por meio da visualização e/ou identificação de indivíduos pela vocalização, no caso de anuros. Os acessos, transectos e armadilhas devem ser instalados em etapa prévia à amostragem.

Figura 30: Esquema da disposição das linhas de *pitfall* e transectos de busca ativa nas áreas em restauração para amostragem da herpetofauna.



Pergunta 15 - Existem diferenças nos padrões de sucessão entre as comunidades da avifauna de áreas afetadas pela deposição de rejeito em processo de restauração e em áreas de floresta não submetidas a este estressor em diferentes escalas da paisagem?

Contextualização

Estudos realizados na Mata Atlântica demonstram que mosaicos de fragmentos próximos a áreas com maior conectividade florestal podem atuar como *stepping-stones*, facilitando a dispersão de alguns elementos entre o conjunto de fragmentos, especialmente se houver alguma permeabilidade na matriz (Marsden et al. 2001; Uezu et al. 2008; Goulart et al. 2015; Barbosa et al. 2017; Emer et al. 2018). Por outro lado, em paisagens mais fragmentadas e representadas por matrizes pouco permeáveis, há uma tendência de fragmentos pequenos e muito isolados serem ocupados por espécies de aves generalistas e típicas de bordas, capazes de se deslocar

por maiores distâncias em matrizes não florestais (Willis 1979; Uezu & Metzger 2011, 2016; Emer et al. 2018). Além disso, estratos maiores de florestas localizados próximos a fragmentos ou a áreas alteradas podem servir como fonte de espécies florestais para estas áreas (Faria et al. 2006; Uezu et al. 2008) ou refúgio de espécies com maior sensibilidade (Uezu & Metzger 2016).

Assim, as comunidades de aves podem ser usadas como indicadoras desses processos, especialmente ao se considerar as espécies indicadoras da boa qualidade ambiental que incluem aves ameaçadas de extinção, endêmicas da Mata Atlântica, dependentes de ambientes florestais, consumidores de frutos de médio e grande porte e insetívoras de solo e sub-bosque.

Hipóteses e predições

- Espera-se que, com o passar do tempo, a composição de espécies de aves nas áreas afetadas pela deposição de rejeito, que estão em processo de restauração, se aproxime daquela presente nas áreas de referência, com um aumento na proporção de espécies indicadoras da boa qualidade ambiental.
- Espera-se que, nas áreas afetadas pela deposição de rejeito localizadas em matriz predominantemente antropizada (trechos a jusante de Paracatu de Baixo), o processo de sucessão associado à restauração seja retardado em comparação com áreas localizadas em matriz predominantemente florestal (trechos a montante de Paracatu de Baixo) pela falta de maiores blocos florestais que sirvam como fontes naquelas áreas.
- Espera-se que as áreas em restauração que foram afetadas pela deposição de rejeito, localizadas em matriz predominantemente antropizada (trechos a jusante de Paracatu de Baixo), abriguem, ao final do monitoramento, uma maior proporção de espécies generalistas em comparação com áreas localizadas em matriz predominantemente florestal, que, por sua vez, deverão apresentar maior proporção de espécies indicadoras da boa qualidade ambiental.

Indicador(es) proposto(s)

- Diversidade, estrutura e composição das comunidades de aves.

Protocolo metodológico

A malha amostral necessária é composta por 60 sítios amostrais, os quais deverão estar distribuídos, na medida do possível, de maneira aproximadamente equânime entre cada uma das três microbacias de interesse. Estes sítios amostrais deverão estar distribuídos da seguinte maneira: a) 20 sítios amostrais de fragmentos florestais de vegetação natural em estágio médio ou avançado de sucessão ecológica e que foram diretamente afetados pela deposição de rejeito em sua totalidade ou em apenas uma porção de sua área. Estes sítios correspondem às Porções de Fragmentos Alvo (PFA) definidas no item “Malha Amostral”. b) 20 fragmentos florestais de vegetação natural em estágio médio ou avançado de regeneração e que não receberam deposição de rejeito, devendo também estar localizados fora da AID, ou seja, do *buffer* de 500 m em relação à ADA. Estes sítios correspondem aos fragmentos de referência definidos no item “Malha Amostral”; c) 10 sítios amostrais em restauração ativa em fragmentos florestais de vegetação natural em estágio inicial de regeneração e que foram diretamente afetados pela deposição de rejeito em sua totalidade ou em apenas uma porção de sua área; e d) 10 sítios em restauração ativa fora da faixa que recebeu deposição de rejeito, mas dentro do *buffer* de 300 m em relação à ADA. Os grupos de sítios amostrais indicados nos itens a e b devem ser os mesmos amostrados para responder à Pergunta 8.

Uma vez que diversos estudos envolvendo outros grupos temáticos serão desenvolvidos nos mesmos sítios amostrais aqui propostos, é muito importante que um planejamento cuidadoso seja realizado de modo a minimizar os impactos do estudo no ambiente e no bom andamento dos trabalhos de outros pesquisadores. A rede de acessos aos pontos e parcelas de amostragem deverá ser planejada de modo a reduzir ao máximo a necessidade de abertura de novas trilhas e o pisoteio do sub-bosque, minimizando assim os impactos sobre o ambiente. Os trabalhos de campo dos diferentes profissionais envolvidos neste estudo deverão ser coordenados de modo a evitar que pesquisadores responsáveis por diferentes grupos temáticos trabalhem simultaneamente em um mesmo sítio de amostragem, de modo a que um grupo não interfira nos trabalhos de campo do outro grupo.

As campanhas deverão ter periodicidade semestral, sendo uma campanha de amostragem durante a estação seca (preferencialmente maio a agosto) e outra durante a estação chuvosa (preferencialmente outubro a março). Essas campanhas deverão ocorrer inicialmente em intervalos de um ano durante os cinco primeiros anos do monitoramento, passando então para intervalos de três anos ao longo dos dez anos subsequentes. A partir dos resultados obtidos durante os primeiros dez anos de monitoramento a necessidade de continuidade deste projeto deverá ser reavaliada. A Equipe Ekos está ciente de que as ações de restauração da Fundação Renova bem como o Plano de Ação do PG30 têm prazo definido para 10 anos. Porém, a equipe entende que pode ser necessário continuar o monitoramento da comunidade de aves para além dos próximos 10 anos, uma vez que as florestas restauradas com essa idade ainda não possuem estrutura comparável às matas em estágio médio e avançado. Assim, a equipe recomenda que sejam avaliadas as alternativas para a continuidade do monitoramento da restauração após os 10 anos de ação da Fundação Renova.

A quantidade e disposição das unidades amostrais (pontos de contagem), o detalhamento dos equipamentos de coleta e o perfil técnico da equipe são os mesmos descritos para a Pergunta 8. Da mesma forma, a taxonomia e sistemática das espécies registradas e a atribuição de características biológicas e ecológicas das espécies (massa corporal, estrato de forrageamento, tipo de habitat, dieta e distribuição geográfica) seguem o protocolo da Pergunta 8.

Pergunta 16 - A regeneração dos ambientes degradados pelo rompimento da barragem e dos ambientes em restauração na bacia está restaurando a funcionalidade dos ecossistemas e permitindo o retorno de processos ecológicos executados por espécies de insetos, mamíferos e aves?

Contextualização

As interações bióticas entre organismos são estruturadoras das dinâmicas ecológica e evolutiva nas comunidades (Thompson 2005; Kennedy et al. 2007). O resultado das interações varia entre antagonismos e mutualismos dependendo dos custos e benefícios para os organismos envolvidos (Chamberlain et al. 2014; Revilla & Encinas 2015). Essas interações são frequentemente condicionais, com seus resultados modulados por fatores como a estrutura do habitat em áreas de sucessão secundária (Silva et al. 2012; Neves et al. 2014) ou mesmo ações de restauração ecológica (Montoya-Pfeiffer et al. 2020). Em sistemas multitróficos compostos por plantas, herbívoros e seus predadores, os resultados das interações podem ser complexos, assim, para avaliar se as medidas de restauração ecológica estão sendo suficientes para o retorno de interações estabelecidas entre distintos níveis tróficos serão utilizadas interações antagonísticas, como herbivoria (Silva

et al. 2012; Neves et al. 2014; Kozlov & Zvereva 2017) e a predação, através da avaliação de modelos artificiais (Low et al. 2014; Sam et al. 2015; Roslin et al. 2017). Para a avaliação do retorno de interações positivas serão avaliados os visitantes florais (Schleuning et al. 2012; Carstensen et al. 2014; Montoya-Pfeiffer et al. 2020).

Os insetos desempenham diversas funções que são fundamentais para o funcionamento dos ecossistemas, dentre elas a dispersão de sementes e a ciclagem de nutrientes (Braga et al. 2013; Crespo-Pérez et al. 2020; Elizalde et al. 2020). As espécies podem estar retornando para as áreas restauradas sem desempenhar as funções ecológicas e serviços ecossistêmicos com a mesma eficiência realizadas nas áreas de referência. Da mesma forma, as espécies podem ser redundantes nas funções que desempenham dentro do ecossistema e, assim, ausência de uma espécie pode ser compensada pela existência de outra que desempenha a mesma função (Nunes et al. 2018; Castro et al. 2020). Por fim, os efeitos da perda ou ganho de espécies no funcionamento do ecossistema podem ser dependentes da qualidade dos habitats, portanto, as ações de restauração ecológica podem ser fundamentais para a retomada dessas funções e serviços ecossistêmicos. Assim, a partir de análises simples, utilizando funções ecológicas realizadas por grupos alvo como formigas e besouros escarabáneos, pode-se mensurar se as ações de restauração ecológica estão sendo eficientes para o retorno de alguns serviços ecossistêmicos prestados por insetos (Braga et al. 2013; Rocha-Ortega et al. 2017; Nunes et al. 2018).

Ambientes naturais garantem a provisão de uma série de benefícios conhecidos como serviços ecossistêmicos (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Mesmo pequenas manchas de vegetação natural podem garantir a diversidade, a funcionalidade do ecossistema e a prestação de serviços ambientais nas áreas do seu entorno (Kremen et al., 2007; Farwig & Berens, 2012, Duarte, et al, 2018). Dentre os serviços ecossistêmicos proporcionados vertebrados em paisagens degradadas estão a polinização e a dispersão de sementes que auxiliam no processo de restauração ambiental (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Secretariado da Convenção sobre Diversidade Biológica, 2006). Nos trópicos, a dispersão de sementes por animais frugívoros ocorre em até 90% das espécies de árvores (Howe & Smallwood, 1982). Diversas espécies de morcegos e de aves são polinizadoras de plantas e se alimentam de frutos de espécies pioneiras de diversas famílias (e.g. Solanaceae, Cecropiaceae, Piperaceae, Melastomataceae, Rosaceae e Rubiaceae (Cantor et al. 2010; Lessa & Costa 2010; Camargo et al. 2011). Associado a diversidade funcional essas espécies de polinizadores e dispersores transitam entre manchas de vegetação através da matriz da paisagem, funcionando como conectores entre áreas mais íntegras e áreas a serem restauradas ou em processo de regeneração. O monitoramento do restabelecimento das funções ecológicas deve ocorrer em áreas de referência e em parcelas onde estão sendo realizadas as ações de restauração ecológica, tanto sobre a mancha de rejeitos quanto em áreas degradadas na Bacia do Rio Doce.

Neste sentido, associado ao programa de recuperação de áreas degradadas da bacia do rio Doce, sugere-se que seja realizado o monitoramento do retorno das interações negativas e positivas, como a herbivoria, predação e polinização, e de algumas funções ecossistêmicas, como dispersão de sementes e ciclagem de nutrientes. Dessa forma, o programa de monitoramento terá uma análise mais completa da restauração ecológica, do uso e do funcionamento desses novos ecossistemas

Hipóteses e predições

- Espera-se que com o avanço da regeneração as espécies de insetos, aves e mamíferos (pequenos mamíferos e morcegos) recolonizem o ambiente e participem de processos ecológicos como herbivoria, predação, polinização, remoção de matéria orgânica dispersão de sementes.

- Espera-se que em áreas sob restauração próximas a áreas-fonte das quais espécies de morcegos e aves frugívoras transitam recebam chuva de sementes de espécies de plantas nativas, facilitando a regeneração.

Indicador(es) proposto(s)

- Taxa de herbivoria por insetos;
- Taxa de predação de lagartas artificiais por artrópodes e vertebrados;
- Taxa de remoção de matéria orgânica (sementes) por insetos;
- Taxa de visitação floral por insetos e aves;
- Taxa de dispersão de sementes por aves e morcegos.

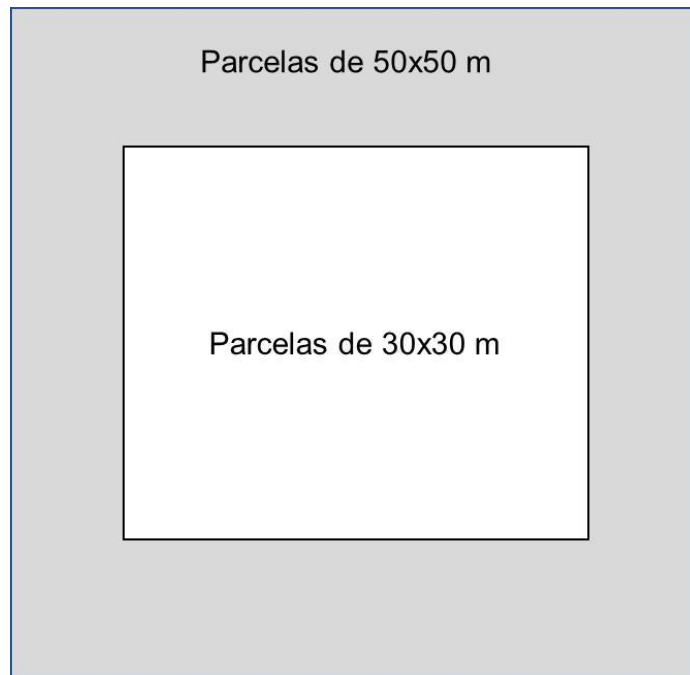
Protocolos metodológicos

Amostragem

Para avaliar a eficiência do processo de restauração planejada e já implantada no domínio espacial do PG30 para restaurar os serviços, processos e interações ecológicas, serão avaliadas 60 áreas em restauração ativa, sendo 20 áreas em restauração ativa sobre a faixa de depósito do rejeito (na ADA), 20 áreas em restauração ativa fora da faixa de depósito do rejeito, mas dentro da ADA e 20 áreas em restauração ativa fora da ADA, e portanto, distante das áreas impactadas pelo rompimento da barragem. Para fins de comparação, além das 60 áreas de restauração ativa, serão selecionadas 20 áreas de referência fora da ADA, totalizando 80 áreas de monitoramento.

Para amostragem dos processos ecológicos mediados por insetos, em cada uma das 80 áreas será alocada uma parcela permanente, de 50x50 m, e dentro dessa parcela será inserida a parcela de 30x30 m onde parte dos indicadores serão monitorados (Figura 31).

Figura 31: Representação esquemática da disposição das duas escalas de parcelas permanentes (50x50 m e 30x30 m) que devem ser utilizadas nos monitoramentos.



Para a amostragem dos processos ecológicos mediados por aves (visitação floral e dispersão de sementes em cada uma das áreas amostrais serão estabelecidos 4 pontos de coleta no mesmo esquema dos pontos de contagem para aves da Pergunta 8. Já para a amostragem dos processos ecológicos mediados por morcegos (visitação floral e dispersão de sementes), em cada uma das 80 áreas serão definidos 4 pontos de coleta nos quais as armadilhas de sementes serão instaladas (ver abaixo).

A avaliação do retorno e persistência de processos ecológicos em áreas em restauração é feita a longo prazo, uma vez que a cobertura florestal leva certo tempo para se estabelecer. Assim, a duração dos monitoramentos precisa ser condizente com as diferentes etapas do processo de restauração. Para insetos, os processos ecológicos devem ser monitorados por no mínimo dez anos, e as campanhas devem ocorrer anualmente na estação úmida (entre o início de novembro e o final fevereiro de cada ano). Tal período coincide com a maior atividade e maior ocorrência de insetos em sistemas tropicais sazonais (Johansson et al. 2020). Após dez anos, deve-se analisar a base de dados e a perspectiva dos efeitos da restauração ecológica e avaliar a necessidade de extensão do prazo. Para aves e morcegos, os processos ecológicos devem ser monitorados por dez anos, com coletas semestrais durante a estação seca e chuvosa nos primeiros seis anos e coletas anuais a partir disso. Após dez anos, deve-se analisar a base de dados e a perspectiva dos efeitos da restauração ecológica, e avaliar a necessidade de extensão desse prazo.

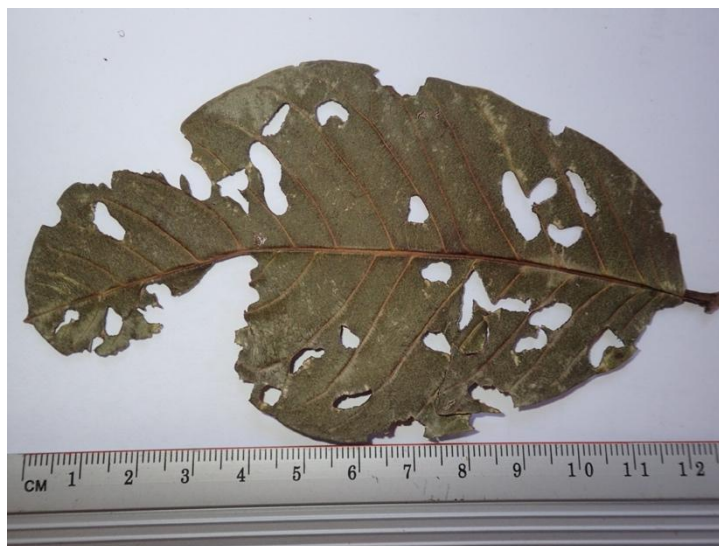
A Equipe Ekos está ciente de que as ações de restauração da Fundação Renova bem como o Plano de Ação do PG30 têm prazo definido para 10 anos. Porém, a equipe entende que pode ser necessário continuar o monitoramento dos processos ecológicos para além dos próximos 10 anos, uma vez que as florestas restauradas com essa idade ainda não possuem estrutura comparável às matas em estágio médio e avançado. Assim, a equipe recomenda que sejam avaliadas as alternativas para a continuidade do monitoramento da restauração após os 10 anos de ação da Fundação Renova.

Herbivoria por insetos

Para a determinação da herbivoria por insetos nas áreas em diferentes cenários de restauração e nas áreas de referência, deverá ser determinada a porcentagem de área foliar removida por insetos mastigadores, seguindo o protocolo global de Mendes et al. (2020). Em cada uma das 80 áreas (60 áreas em restauração e 20 áreas referência), deverá ser marcada uma parcela permanente de 50x50 m. Em cada parcela, deverão ser amostrados 25 indivíduos de plantas lenhosas, com diâmetro na altura do peito (DAP) maior ou igual 5mm e altura até 2.5m. Sugere-se a amostragem de pelo menos 5 espécies diferentes de plantas em cada parcela, com 5 réplicas individuais por espécie, espaçadas pelos menos 2.0 m entre os indivíduos. A amostragem deve ser feita ao final da estação chuvosa, entre fevereiro e março de cada ano (período esse em que as plantas já acumularam herbivoria e insetos estão abundantes), por 10 anos.

Em cada indivíduo de planta lenhosa, deve-se adicionar uma etiqueta metálica permanente, numerada, e fixada ao tronco principal com prego inoxidável. De cada indivíduo, deverão ser amostradas 50 folhas ao acaso. As folhas deverão ser numeradas seguindo a sequência 1.1 a 1.50 até 25.1 a 25.50, individualizando assim a planta hospedeira e a folha equivalente ao conjunto amostral de 50 folhas por planta. Para a numeração das folhas, utilizar caneta permanente preta, adicionando o número na face adaxial, canto inferior direito, evitando-se a nervura central. Após a coleta, as folhas deverão ser prensadas em prensa botânica com jornal e papelão, identificadas por número da parcela e número da área de restauração ou referência. Coletar também uma excisata por planta hospedeira para futura identificação taxonômica após consulta a chaves botânicas ou especialistas. As folhas deverão ser secas em estufa a 45°C por até 72 horas. Após a secagem, as folhas devem ser digitalizadas em scanner de mesa, utilizando-se escala milimétrica (exemplo: régua plástica) para referência de tamanho (ver Figura 32).

Figura 32: Exemplo de imagem digital de folha atacada por insetos mastigadores.



Para a determinação do nível de herbivoria por insetos mastigadores nas folhas, as imagens deverão ser analisadas em softwares para a determinação da porcentagem de área foliar perdida após o ataque de insetos herbívoros. Sugere-se o uso de ImageJ® por Schneider et al. (2012) ou BioLeaf© por Machado et al. (2016). Cada folha deverá ser avaliada, calibrada em mm e a área foliar total (em mm²) deverá ser determinada contornando-se a área da folha, após preenchimento de bordas perdidas por herbivoria. A área consumida por insetos (mm²) deverá ser determinada nas imagens das folhas através da soma das áreas perdidas medindo-se as remoções individuais em cada lâmina foliar. A porcentagem de herbivoria (H) deverá ser determinada para cada planta como $H = (\sum \text{áreas perdidas} / \text{área foliar total}) * 100$.

Como métrica para avaliação da herbivoria (H) deverá ser utilizada a porcentagem média de remoção de área foliar, por espécie de planta, por parcela. As 50 folhas por planta deverão ser usadas como réplicas dos indivíduos e os 5 indivíduos como réplicas das espécies de plantas.

Predação de lagartas artificiais por artrópodes e vertebrados

Para a determinação da predação nas áreas em diferentes cenários de restauração e nas áreas de referência, deverá ser determinada a porcentagem de predação em modelos artificiais confeccionados em plasticina, simulando lagartas de Lepidoptera. Tal método tem se mostrado eficiente para determinar se a predação por aves e artrópodes (como aranhas, formigas e vespas) exerce uma pressão seletiva na regulação de presas (Richards & Coley 2007) e nos níveis de herbivoria em plantas via cascatas tróficas (Barber 2012, Low et al. 2014). Além disso, os modelos artificiais simulando presas possuem uma série de vantagens que os tornam particularmente atrativos: são simples de confeccionar, baratos, adaptáveis a diferentes testes de hipóteses, permitem grande número de replicações e a grande vantagem de fornecer informação sobre a identidade do predador (Low et al. 2014).

Em cada parcela de 50x50 m já marcadas para avaliar os níveis de herbivoria por insetos em plantas hospedeiras, serão marcados 15 indivíduos de plantas lenhosas, com diâmetro na altura do peito maior que 10 cm e entre 1.5 e 2.0 m de altura. Em cada planta, serão adicionadas 5 lagartas artificiais, como unidades independentes (n=75 lagartas por parcela), distribuídas em toda a copa. Cada lagarta deverá ser confeccionada em massa atóxica verde, do tipo plasticina, com 25 mm de comprimento e 5 mm de largura. Para permitir a fixação das lagartas artificiais nas plantas, essas devem ser moldadas no entorno de arame galvanizado fino (0.45 mm de diâmetro, 8 a 10 cm de comprimento), para permitir que as lagartas sejam fixadas nas plantas usando-se as extremidades do arame para enrolá-las em ramos finos (3-10mm) das plantas que servirão de suporte (Figura 33). As lagartas deverão ser adicionadas nas partes externas da copa, de modo a não ficarem escondidas na folhagem (i.e., visíveis a aves e artrópodes predadores, Zvereva et al. 2019). Em um mesmo indivíduo de planta, as lagartas devem ser colocadas com pelo menos 30 cm de distância entre elas. A amostragem deve ser feita ao final da estação chuvosa, entre fevereiro e março de cada ano (período esse em que as plantas normalmente apresentam insetos herbívoros em abundância), por 10 anos.

Figura 33: Representação ilustrativa de lagartas artificiais, em plasticina atóxica verde, e arame galvanizado para fixação das lagartas nas plantas.



Após 3 dias de exposição, as lagartas artificiais devem ser vistoriadas e as marcas encontradas atribuídas a uma classe de predadores. A identificação dos predadores responsáveis pelas marcas deve ser feita através de categorias gerais, como aves, mamíferos, formigas e/ou vespas, cujas marcas deixadas nos modelos podem ser diferenciadas através do formato do bico ou das mandíbulas, conforme imagens e descrição em Low et al. (2104). Sempre que possível, a vistoria das lagartas artificiais deve ser feita por dois sujeitos independentemente. Registre o número de marcas por lagarta predada e caso a lagarta artificial tenha sido completamente removida do arame, registre como "removida". Fotografe em campo as lagartas artificiais encontradas com marcas, atribuindo às imagens o número da árvore, da parcela e da área (restauração ou referência). Alise todas as lagartas com marcas, substitua lagartas completamente removidas e avalie novamente as marcas no 10º dia após a montagem do experimento, quando todas as lagartas devem ser removidas e avaliadas para análises de sobrevivência.

Como métrica para avaliação da predação, deverá ser avaliada a frequência de distribuição das marcas nos modelos de lagartas no 3º e 10º dias de exposição, a distribuição de frequência dos diversos tipos de predação e análises de curva de sobrevivência.

Remoção de sementes por formigas (Formicidae) e besouros escarabaeíneos (Coleoptera, Scarabaeinae):

Para o monitoramento do serviço de remoção de sementes por formigas, serão utilizadas sementes artificiais, dessa forma garantindo que não serão introduzidas espécies vegetais nas parcelas de monitoramento. Em cada unidade amostral (parcela de 30x30 m) serão dispostas quatro arenas de remoção nos vértices da parcela, e uma no centro da parcela. Em cada arena de remoção serão colocadas 10 sementes artificiais em saquinhos de papel (8x13 cm).

As sementes artificiais serão fabricadas com miçangas de 2 mm de diâmetro envolvidas por uma mistura atrativa (Rabello et al. 2014). Essa massa irá representar o arilo (porção atrativa dos frutos carnosos). As sementes devem seguir as seguintes proporções de ingredientes: gordura vegetal (75%), frutose (4.8%), sacarose (0.5%), glicose (4.7%), caseína (7%), carbonato de cálcio (3%) e maltodextrina (5%). Para a fabricação das sementes a gordura vegetal hidrogenada deve ser derretida e depois misturada com o restante dos ingredientes. Após o resfriamento envolver todas as miçangas com a massa branca formada em um tamanho de cerca de 4 mm. Agrupar 10 sementes artificiais em sacos de papel pardo. As sementes artificiais devem ser armazenadas em geladeira até o dia de sua utilização.

Para garantir que as sementes artificiais sejam removidas predominantemente por formigas é necessário impedir o acesso às sementes por outros animais (ex: aves, roedores e outros mamíferos). Para isso, as sementes devem ser protegidas por arenas, que consistem de potes plásticos (250 ml) com três aberturas laterais equidistantes de 1 cm². Os potes devem ser fixados junto ao solo, com a boca rente à superfície, onde as formigas podem acessar as sementes através das aberturas laterais. As arenas contendo as sementes artificiais devem permanecer no campo por 24 horas. Após 24 horas, serão contabilizadas as sementes que foram carregadas para fora da arena, as que foram predadas e as que foram removidas para longe (aquelas que não foram encontradas após as 24 h).

Como métricas para o monitoramento da taxa de remoção de sementes artificiais por formigas serão utilizadas as porcentagens médias de sementes carregadas, predadas e removidas por parcela em cada período amostral.

Para o monitoramento do serviço de remoção de sementes e de matéria orgânica realizadas por besouros escarabeíneos serão utilizadas arenas circulares (Braga et al. 2013). Em cada unidade amostral (parcela de 30x30 m) será disposta uma arena de remoção no centro da parcela.

Cada arena circular possui o tamanho de 1 m de diâmetro, cuja borda é delimitada por uma cerca (aproximadamente 20 cm de altura) construída com uma tela de sombreamento, mantida por 10 varas de bambu (espetos para churrasco) (Figura 34). A tela limita o movimento horizontal dos besouros à área contida, permitindo que eles entrem e acessem a isca atrativa, mas impedindo que ultrapassem a área delimitada. Dessa forma, os besouros enterram as fezes dentro da área delimitada, possibilitando uma quantificação mais precisa das funções examinadas.

Figura 34: Foto da arena de avaliação de funções ecológicas realizadas por besouros escarabaeíneos. Foto de Cassio Nunes.



A isca utilizada nas arenas para atração de besouros escarabaeíneos consiste em fezes suínas frescas, de porcos tratados com alimentação caipira. As fezes suínas são similares às fezes dos mamíferos mais abundantes presentes na região, e são um atrativo eficaz para uma ampla gama de espécies de besouros escarabaeíneos. Em cada porção de fezes, serão colocadas 50 miçangas de plástico, usadas como imitações de sementes, para estimar a função da dispersão secundária de sementes de três tamanhos: 25 sementes pequenas (2 mm de diâmetro), 15 sementes médias (5 mm de diâmetro) e 10 sementes grandes (10 mm de diâmetro).

Além do experimento para remoção das sementes, na mesma arena será inserida uma porção experimental de fezes e um sachê (50 g) composto pela mesma isca para controle de perda/ganho de umidade para o cálculo de remoção de matéria orgânica. Após 24h as arenas serão recolhidas e será avaliada a proporção de sementes dispersadas e a proporção de matéria orgânica removida.

Como métricas para o monitoramento da taxa de remoção de sementes artificiais e matéria orgânica por besouros escarabaeíneos serão utilizadas as porcentagens médias de sementes carregadas de cada tamanho e a média de matéria orgânica removida por parcela em cada período amostral.

Visitantes florais (insetos e aves)

Para a determinação da visitação floral por insetos nas áreas em processo de restauração e áreas de referência, as mesmas parcelas de 50x50 m, permanentemente marcadas para a avaliação da herbivoria e da predação, deverão ser utilizadas. Diversos insetos e outros animais como aves e morcegos visitam as flores para se alimentarem de pólen, néctar e outros recursos, mas nem sempre as visitas resultam em polinização. A visitação floral, no entanto, é um bom indicador de interações ecológicas, tanto positivas quanto negativas (Alves-dos-Santos et al. 2016) e fornece uma primeira estimativa das possíveis interações entre plantas e animais visitantes (Kevan 2008, Rader et al. 2016).

Dentro de cada uma das 80 parcelas, serão marcadas e identificadas as espécies de plantas apresentando flores na estação úmida (entre novembro e fevereiro) e na estação seca (entre junho e setembro) de cada ano. As plantas floridas deverão ser marcadas com etiquetas metálicas permanentes numeradas e deverão ser identificadas por meio de fotografias, exsiccatas e/ou auxílio de especialistas. As amostragens de visitantes florais deverão ser fito-centradas, onde as plantas marcadas serão acompanhadas e os insetos visitantes serão capturados. Em cada estação de coleta, deverá ser feita a observação direta das flores por 10 minutos em cada planta, seguida de coleta ativa dos insetos com rede entomológica. Deve-se registrar para cada planta avaliada, o número de visitantes, o horário de visita e a duração de cada visita (em minutos). As observações e coletas deverão ser feitas pela manhã até o início da tarde, que são os períodos de maior atividade de grande parte dos visitantes e polinizadores. As seguintes características florais das espécies avaliadas em cada parcela devem ser registradas: cor da flor, arranjo floral (flores simples ou inflorescências), simetria da flor (actinomórfica, zigomórfica ou assimétrica) e diâmetro da corola (veja Benadi et al. 2014). Como medida da recompensa floral ofertada a visitantes, deve-se avaliar a presença de pólen e/ou néctar e a concentração de açúcar no néctar deverá ser medida com o auxílio de refratômetros portáteis (RT-30ATC e RT-82, Instruterm®).

Todos os insetos visitantes capturados serão acondicionados em tubos plásticos do tipo *Falcon* em campo (ex: abelhas, moscas e besouros) e/ou envelopes entomológicos confeccionados com papel vegetal (ex: borboletas nectarívoras), identificados com data, horário de coleta, coletor, número do indivíduo florido no qual foi coletado, número da parcela e número da área em restauração ou referência. Os indivíduos serão sacrificados por congelamento, posteriormente secos em estufa a 45°C por 48 h, devidamente montados em alfinetes entomológicos e/ou triângulos entomológicos e duas etiquetas devem ser adicionadas, uma com as informações de coleta e outra com as informações taxonômicas. Os visitantes florais serão posteriormente identificados com o auxílio de guias, chaves de identificação e/ou consulta a especialistas.

Como métricas de avaliação da visitação floral serão computadas, em cada área, a riqueza de visitantes florais, a abundância de visitantes florais, a riqueza de espécies floridas, a frequência de visitas em cada planta e a duração (em minutos) das visitas de insetos nas flores. Os dados devem ser avaliados separadamente por estação do ano (seca e chuvosa) e por ano de amostragem.

Para avaliação do processo de visitação floral por aves deverão ser amostrados 20 sítios naturais afetados (fragmentos alvo), 20 sítios naturais não afetados (fragmentos referência), 10 sítios afetados por rejeito em restauração, 10 sítios em restauração sem rejeito, mas dentro do buffer. Em cada um dos sítios serão amostrados quatro pontos, equivalentes aos pontos de contagem de aves da Pergunta 8.

A avaliação da visitação floral será feita a partir da metodologia adotada na Pergunta 9 para avaliação dos

nectarívoros. Serão conduzidos censos de beija-flores nos mesmos pontos utilizados para a amostragem por pontos de contagem, porém utilizando bebedouros comerciais abastecidos com solução de sacarose como atrativo (as populares “garrafinhas de beija-flor”). A periodicidade do monitoramento deverá ser semestral, sendo uma campanha de amostragem durante a estação seca (maio a agosto) e outra durante a estação chuvosa (outubro a março). Essas campanhas semestrais deverão ocorrer inicialmente em intervalos anuais durante dez anos de monitoramento. A partir dos resultados obtidos após esse período a necessidade de continuidade deverá ser reavaliada.

Dispersão de sementes por aves e morcegos

Para aves frugívoras dispersoras de semente será adotado um protocolo próprio para a coleta dos dados necessários para responder à esta pergunta. Deverão ser amostrados 20 sítios naturais afetados (fragmentos alvo), 20 sítios naturais não afetados (fragmentos referência), 10 sítios afetados por rejeito em restauração, 10 sítios em restauração sem rejeito, mas dentro do *buffer*. Em cada um dos sítios serão amostrados quatro pontos, equivalentes aos pontos de contagem de aves da Pergunta 8.

Optou-se pelo uso de frutos artificiais em detrimento aos frutos naturais em virtude da possibilidade de se obter um maior controle do sistema de estudos e o alcance de resultados adequados em curto espaço de tempo (Alves-Costa & Lopes, 2001; Arruda et al., 2008; Cazetta et al., 2009; Duan et al., 2014; Pires et al., 2018; Alves, 2020). Isso porque as diferentes espécies de frutos ornitócoricos apresentam níveis muito distintos de atratividade para aves, variando também dramaticamente quanto à sua disponibilidade e abundância ao longo do ano e do estágio de sucessão dos fragmentos florestais amostrados.
















Os frutos artificiais deverão ser confeccionados com massa de modelar atóxica e resistente ao ressecamento pelo sol (o que evita que o fruto rache e caia ao chão) e à chuva (o que evita que o fruto seja derrubado pela chuva). Os frutos deverão ter aproximadamente 15 mm de diâmetro, formato esférico e cor vermelha intensa, a qual é bastante atrativa para aves frugívoras. (Alves-Costa & Lopes, 2001; Arruda et al., 2008). Após modelados, os frutos serão trespassados por uma linha escura amarrada com uma miçanga negra na sua extremidade, que servirá como um “stop” a ser fixado na porção inferior do fruto, impedindo que ele caia. A outra ponta da linha deverá ser deixada com aproximadamente 50 mm de fio livre, para que o fruto possa ser atado diretamente a um galho de arbusto ou arvoreta.

Em cada um dos quatro pontos de contagem da pergunta 8 deverão ser alocados 40 frutos artificiais, de modo a totalizar 160 frutos por sítio amostral. Os frutos deverão estar distribuídos no entorno de cada ponto da seguinte maneira: 10 frutos em cada um dos quatro arbustos/arvoretas selecionados, os quais deverão estar situados em um raio de aproximadamente 5 metros ao redor do ponto de contagem, um arbusto/arvoreta em cada ponto cardinal. Este é um desenho tentativo que, obviamente, precisará sofrer pequenos ajustes em virtude da disponibilidade de locais adequados para se instalar os frutos artificiais. Os frutos deverão ser instalados em uma altura de aproximadamente 1,5 a 2,0 m, sempre em locais bem visíveis, de modo a facilitar a localização visual dos frutos pelas aves frugívoras (poderá ser necessário remover algumas poucas folhas e ramos da árvore/arbusto para melhorar a visualização). Os frutos artificiais não deverão ser atados a plantas que contenham frutos naturais, de modo a se evitar possíveis interferências nos resultados do experimento.

Os frutos deverão ficar expostos durante um intervalo de cinco dias. A extensão deste período poderá ser reavaliada após um piloto inicial. Caso as taxas de frugivoria estejam muito elevadas este período poderá ser reduzido. Caso contrário, estendido. Findo esse prazo, o pesquisador deverá checar os frutos para verificar a presença de marcas que revelam interações com a fauna. Essas marcas deverão ser contadas e classificadas de acordo com o tipo de animal que interagiu (e.g. marcas de bico indicam aves, marcas de dentes indicam pequenos mamíferos) e, no caso de aves, o seu tamanho aproximado (pequeno, médio e grande). Para auxiliar nessa classificação, ver a Figura 35, extraída de Alves (2020). Embora essa aproximação de tamanho seja grosseira, ela permite compreender melhor o tipo de serviço ecossistêmico prestado pela comunidade de aves frugívoras (e.g. aves grandes geralmente dispersam sementes de maior porte).

Aves frugívoras são animais orientados predominantemente de maneira visual. Dessa maneira, elas provavelmente percebem que a fruta não é comestível apenas após a bicarem. Já os mamíferos frugívoros, por se utilizarem amplamente de pistas olfatórias (Alves-Costa & Lopes, 2001), geralmente demonstram, pouco interesse nas frutas artificiais (Alves-Costa & Lopes, 2001).

Figura 35: Fotografias mostrando os diferentes tipos de marca deixadas pela fauna após interação com os frutos artificiais. Fonte: Alves (2020).

	Descrição	Fotos		
Aves pequeno porte	Marcas triangulares que não atingem as duas extremidades do fruto			
Aves médio porte	Marcas triangulares que atingem as duas extremidades do fruto, mas dificilmente capazes de engoli-los inteiros			
Aves grande porte	Marcas triangulares que atingem as duas extremidades do fruto e potencialmente com capacidade de engolir			
Mamíferos	Marcas de dentes de roedores, marsupiais e primatas			
Invertebrados	Pequenas marcas de garras, mandíbulas ou ovopositores de invertebrados			

Para avaliar o papel dos morcegos no processo de dispersão de sementes nas áreas sob restauração deverão ser amostrados 10 sítios naturais afetados (fragmentos alvo), 10 sítios naturais não afetados (fragmentos referência), 10 sítios afetados por rejeito em restauração, 10 sítios em restauração sem rejeito, mas dentro da ADA. Morcegos frugívoros são um dos mais importantes grupos de dispersores de sementes nos neotrópicos.

Para amostrar morcegos frugívoros, em cada um dos sítios de restauração e dos fragmentos afetados e não afetados pelo rejeito serão instaladas 10 redes de neblina de 12 m x 2,5 m que serão abertas no horário crepuscular e fechadas após 4 horas de amostragem. Os morcegos frugívoros capturados serão acomodados em sacos de algodão limpos, por no mínimo duas horas, tempo necessário para coletar amostras de fezes destes animais. Após isso, os morcegos serão marcados com colar, terão medidas corporais e estado reprodutivo anotados, sendo, em seguida, soltos no mesmo local da captura. As fezes coletadas serão triadas em laboratório; e testes de germinação e viabilidade das sementes serão aplicados conforme metodologia apresentada a seguir.

Adicionalmente, para avaliar o papel dos morcegos frugívoros no processo de dispersão de sementes em áreas de restauração por morcegos utilizados abrigos artificiais com adição de óleos essenciais de espécies vegetais de interesse (*Cecropia*, *Solanum* e *Piper*). Os abrigos artificiais serão produzidos assim como em Kelm et al. (2008), simulando buracos em troncos de árvores. Serão instalados três abrigos artificiais em cada um dos 10 sítios de restauração em área com rejeito e nos 10 sítios de restauração em áreas sem rejeito. Os abrigos serão instalados de 2 a 3 metros do solo, distantes pelo menos 30 metros entre si. Abaixo de cada abrigo será instalada uma armadilha de sementes. Estas armadilhas seguirão o padrão adotado em Reid et al. (2013). Um conjunto de três vasilhas, cada uma com um tipo de óleo essencial será colocado em cada abrigo instalado em cada sítio amostral da ADA. Os óleos essenciais serão produzidos utilizando frutos dos vegetais de interesse (*Cecropia*, *Solanum* e *Piper*). Estes óleos essenciais serão acondicionados em vasilhame de vidro de 40 ml com tampa perfurada, sendo introduzido um cordão de algodão, semelhante a um pavio (uma vasilha para cada óleo essencial).

Outras três armadilhas de sementes, sem uso de abrigos, serão instaladas também nos fragmentos florestais afetados e não afetados pelo rejeito. Os abrigos e as armadilhas de sementes serão vistoriados durante as campanhas. A campanhas deverão ter periodicidade semestral durante os primeiros 5 anos do monitoramento e anual a partir do sexto ano. A avaliação do potencial de contribuição de morcegos como dispersores de sementes nas áreas sob restauração será feita comparando o volume e a diversidade de sementes capturadas nas armadilhas com e sem abrigos artificiais.

Em todas as campanhas, as amostras fecais dos morcegos frugívoros serão coletadas em campo, acondicionadas em tubos eppendorf e levadas para o laboratório, onde serão triadas e as sementes separadas. Em campo, também serão coletados frutos de plantas potencialmente dispersas por vertebrados, e que serão identificados e levados para laboratório para montagem do banco de imagens. As sementes serão identificadas através da comparação com descrição em bibliografia e comparação com a coleção de referência a ser montada a partir de sementes de frutos coletados nas áreas de estudo, à medida em que forem encontrados materiais férteis pelas equipes de botânica. As sementes da coleção de referência deverão ser fotografadas sob os 3 planos para permitir a sua correta identificação. Para as fotografias, as sementes deverão ser embebidas em água destilada por 24h para garantir homogeneidade de turgor nas células da epiderme. Para o teste de germinação, as sementes triadas nas fezes e aquelas provenientes dos frutos coletados em campo serão tratadas lavadas em água corrente por 1 minuto, secas à sombra e colocadas em sacos de cultivo de mudas

umedecidos com água destilada. Os experimentos de germinação devem ser realizados no máximo uma semana após a coleta do material. Também será utilizado como substrato amostras do solo coletado na área impactada. Os sacos de mudas serão colocados em casa de vegetação com irrigação automática 3 vezes ao dia. O experimento será monitorado, o substrato será frequentemente umedecido e a germinação verificada através da protrusão da radícula. Serão estabelecidas pelo menos 8 réplicas para cada tipo de substrato, idealmente com 25 sementes cada.

Para verificar a viabilidade das sementes que não germinaram, após os experimentos de germinação será aplicado o teste de tetrazólio (Brasil, 1992). De acordo com protocolo do Ministério da Agricultura e Abastecimento (Brasil 2009), as sementes serão colocadas em placas de Petri e embebidas em água destilada sobre folha dupla de papel filtro durante 24 horas na temperatura de 25°C. Após esse período, serão seccionadas para expor o embrião e imersas em solução de 2, 3, 5 - trifenil cloreto de tetrazólio a 0,1%, durante 24 horas na temperatura de 30°C, sendo as placas de Petri envolvidas em folha dupla de papel alumínio para evitar a fotodegradação do reagente. Segundo França Neto et al. (1988), o teste com tetrazólio permite detectar a presença da respiração celular, uma vez que quando as células do tecido exposto estão vivas, ocorre a redução do sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) pelas desidrogenases, resultando na formação de um composto avermelhado conhecido como trifenilformazan. Tecidos não viáveis não reagem e consequentemente não são coloridos. Já tecidos em deterioração terão maior intensidade de difusão da solução pelas membranas celulares comprometidas e apresentarão coloração mais intensa (vermelho escuro). Tais aspectos das sementes serão detectados com o uso de lupas estereoscópicas para determinação de viabilidade.

6. SÍNTESE DOS TEMAS, PERGUNTAS, INDICADORES E PROGRAMA DE AMOSTRAGEM

Em síntese a presente proposta do novo programa de monitoramento da biodiversidade terrestre está focada em três Temas. Cada tema possui um conjunto de perguntas que agregam indicadores. Considerando os grupos biológicos associados a uma mesma pergunta a proposta aponta 12 indicadores biológicos a serem monitorados em diferentes contextos na bacia e que buscam detectar respostas aos estressores em diferentes níveis e escalas biológicas (Tabela 15). A síntese da amostragem do programa de monitoramento, considerando a malha amostral proposta e os detalhamentos metodológicos de cada grupo indicador, está sintetizada na Tabela 16.

Tabela 15: Síntese dos temas, perguntas e indicadores

TEMAS	TEMA 1: Quais os impactos crônicos (persistentes ou recorrentes) do evento sobre as espécies da fauna e flora terrestres da Bacia do rio Doce, e qual a magnitude e abrangência espacial e temporal destes impactos?		TEMA 2: Há uma tendência de melhoria de condições ambientais e processos ecológicos favoráveis para o restabelecimento de populações de animais e plantas afetadas pelo rompimento da barragem?	TEMA 3: As ações de restauração, recuperação e compensação da bacia do rio Doce estão levando a um aumento na cobertura de formações naturais, na abundância, distribuição ou riqueza de espécies ou grupos funcionais ameaçados, sensíveis ou chave, nos diferentes contextos afetados?	
SUBTEMAS	Contaminantes	Efeitos derivados do impacto nas comunidades de flora e fauna.	Melhoria na condição geral da bacia do rio Doce	Impactos da restauração ecológica sobre fauna, flora e processos ecológicos pós-desastre	
PERGUNTAS	Perguntas 1, 2 e 3	Perguntas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Pergunta 11	Pergunta 12	Perguntas 13, 14, 15 e 16
INDICADORES	1) Contaminantes em plantas e animais; 2) Dano biológico em plantas e vertebrados	3) Diversidade, estrutura, composição e funcionamento das comunidades de plantas, insetos, aves e pequenos mamíferos; 4) Qualidade nutricional e assimetria flutuante em insetos 5) Abundância populacional de <i>P. geoffroanus</i> ; 6) Ocupação de <i>H. maximiliani</i>	7) Métricas da paisagem	8) Condições físicas e químicas do solo; 9) Diversidade da vegetação 10) Funções e serviços ecossistêmicos	11) Diversidade, estrutura e composição das comunidades de insetos, anfíbios, répteis squamata e aves; 12) Processos ecológicos de herbivoria, predação, remoção de matéria orgânica, polinização e dispersão de sementes

Tabela 16: Síntese do programa de amostragem de cada grupo indicador dos três temas gerais (Cores seguem categorização da Tabela 15)

Indicadores	Pergunta	Sítios amostrais	No. de sítios	Região	Periodicidade	Duração (anos)
Contaminantes na vegetação	1	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Semestral	5
Danos na vegetação	2	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Semestral	5
Contaminantes e danos em girinos	3	Corpo d'água lântico	20 (10 ADA e 10 Ref)	Fundão-UHE RN	Anual	2 → 10
Contaminantes e danos em <i>Phrynos geoffroanus</i>	3	Trechos de rio	13 (7 ADA e 6 Ref)	Bacia rio Doce	Anual	2 → 10
Contaminantes e danos em animais	3	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Semestral	5
		Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Anual (insetos)	2 → 10
		Ilhas fluviais	5	Foz do rio Doce	Anual	5
		Restingas	6 (3 ao norte e 3 ao sul da foz do rio Doce)	Restingas no ES	Anual	5
Estrutura, composição e funções em comunidades vegetais	4	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Anual	5
Estrutura e composição de comunidades de insetos	5	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Anual	5 → 10
Qualidade nutricional em insetos	5	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Anual	5 → 10
Assimetria flutuante em insetos	5	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Anual	5 → 10
Abundância de <i>Phrynos geoffroanus</i>	6	Trechos de rio ¹	10 (4 Alvo e 6 Ref)	Bacia rio Doce	Anual	3 → 9
Ocupação de <i>Hydromedusa maximiliani</i>	7	Riachos	10	Fundão-UHE RN	Anual	2 → 10
Estrutura e composição de comunidades de aves de interior	8	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Semestral	5
Estrutura e composição de comunidades de aves polinizadoras e dispersoras	9	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Semestral	5
Estrutura e composição de comunidades de pequenos mamíferos	10	Fragmentos florestais	40 (20 Alvo e 20 Ref)	Fundão-UHE RN	Semestral	5
Métricas da paisagem ADA	11	Fragmentos florestais	Todos	ADA rejeito	Bianual	5 → 10
Métricas da paisagem Fundão-UHE Risoleta Neves	11	Fragmentos florestais	Todos	Subbacias	Bianual	5 → 10
Métricas da paisagem subbacias do rio Doce	11	Fragmentos florestais	Todos	Bacia rio Doce	Bianual	5 → 10
Condições físicas e químicas do solo	12	Áreas de restauração e fragmentos florestais	100 (20 em: RR; R_ADA; F_ADA; Flnt e FFR) ²	Fundão-UHE RN	Variável	10
Estrutura e funções em comunidades vegetais	12	Áreas de restauração e fragmentos florestais	100 (20 em: RR; R_ADA; F_ADA; Flnt e FFR) ²	Fundão-UHE RN	Variável	10
Diversidade, estrutura e composição das comunidades de insetos terrestres	13	Áreas de restauração e fragmentos florestais	80 (20 em RR; R_ADA; F_ADA e FFR) ²	Fundão-UHE RN	Anual	10
Diversidade, estrutura e composição das comunidades de anfíbios e répteis Squamata	14	Riachos (anfíbios)	30 (10 ADA; 10 INT_R; 10 REF) ³	Fundão-UHE RN	Anual	10
		Lagoas (anfíbios)	30 (10 ADA; 10 INT_R; 10 REF) ³			
		Fragmentos florestais	40 (10 RR; 10 R_ADA; 10 F_ADA; 10FFR) ²			
Estrutura e composição de comunidades de aves	15	Áreas de restauração e fragmentos florestais	60 (10 RR; 10 R_ADA; 20 PFA; 20 FFR) ²	Fundão-UHE RN	Semestral	10
Herbivoria, predação, remoção de sementes e visitação floral por insetos	16	Áreas de restauração e fragmentos florestais	80 (20 em RR; R_ADA; F_ADA e FFR) ²	Fundão-UHE RN	Anual	10
Visitação floral aves	16	Áreas de restauração e fragmentos florestais	60 (10 RR; 10 R_ADA; 20 PFA; 20 FFR) ²	Fundão-UHE RN	Semestral	10
Dispersão de sementes por aves	16	Áreas de restauração e fragmentos florestais	60 (10 RR; 10 R_ADA; 20 PFA; 20 FFR) ²	Fundão-UHE RN	Semestral	10
Dispersão de sementes por morcegos			40 (10 RR; 10 R_ADA; 10 PFA; 10 FFR) ²			

1- Trechos de rio com pontos distantes pelo menos 1km daqueles selecionados para a Pergunta 3; 2- RR: Restauração sobre rejeito; R_ADA: Restauração na ADA fora de rejeito; F_ADA: Restauração fora da ADA; Flnt: Fragmentos intermediários e FFR: Fragmentos de referência; 3- ADA: Trechos de corpos d'água afetados e sob restauração natural passiva; INT_R: Trechos de corpos d'água afetados e que sofreram intervenção para restauração; REF: Trechos de corpos d'água não afetados.

7. PROTOCOLOS GERAIS PARA ANÁLISES ESTATÍSTICAS E CURADORIA DOS DADOS

O objetivo principal deste projeto de monitoramento deve ser o de fornecer respostas claras aos órgãos reguladores, aos tomadores de decisão e à sociedade sobre a situação de impacto e recuperação da Bacia do rio Doce pós rompimento da barragem de Fundão. Para tal, é necessário que o conjunto de análise dos dados obtidos – que naturalmente devem vir de uma malha amostral e desenho robustos – siga alguns princípios básicos.

Primeiramente, é necessário que todas as análises sejam coordenadas e eventualmente conduzidas por profissional com doutorado, com pelo menos 8 anos de experiência tanto em Ecologia quanto em Análise de Dados Ecológicos, preferencialmente com publicação científica internacional robusta. Os modelos e técnicas propostas devem ser aplicados utilizando as métricas propostas pelos especialistas de cada grupo (Ver Anexo 11). Esta é uma etapa fundamental, principalmente considerando-se a enorme disponibilidade de softwares e técnicas existentes. Mais do que ser capaz de executar as análises, é necessário entender suas premissas matemáticas (e como checá-las), aplicações na área e interpretações válidas.

Em segundo lugar, as análises devem ser executadas unicamente de forma a responder com clareza às perguntas propostas, nunca sendo um motivo de complicação excessiva à interpretação (Sober 2015).

Terceiro, a análise deve, sempre que possível, ser aplicada transversalmente entre os diferentes grupos biológicos estudados (abordagem multitaxa), com o objetivo de se obter uma inferência robusta sobre os padrões e mecanismos naturais em estudo. Na prática, se uma análise proposta para um grupo biológico é extensível a todos os grupos (i.e. compartilha premissas, métricas e raciocínio lógico de proposição), ela deve ser executada e os resultados discutidos como uma unidade.

Por fim, não cabe a este documento determinar o software de análises a ser utilizado, uma vez que há várias opções de mercado disponíveis capazes de executar as análises com o nível desejado. É recomendado, todavia, o uso de softwares Livres, pois os mesmos contam com várias características importantes, dentre elas: (a) código aberto, garantindo transparência; (b) ampla disponibilidade e custo zero, garantindo reprodutibilidade e (c) robustez e manutenção constante pela comunidade de usuários. Neste sentido, sugere-se fortemente a adoção de plataformas como R (R Core Team 2020 ou mais recente) ou Python (<http://www.python.org/>). Para todas as análises, serão indicados os pacotes do programa R capazes de executar as análises. Os mesmos podem ser substituídos, desde que mantidos os conjuntos de análises.

Com estes princípios em mente, o protocolo de análise de dados deverá seguir a lógica de se apoiar nas perguntas gerais propostas, e não nos grupos biológicos. Os modelos e técnicas propostas devem ser aplicados utilizando as métricas propostas pelos especialistas de cada grupo como variável resposta nos modelos, sempre tendo como norteador das variáveis explicativas as hipóteses gerais propostas. Naturalmente, como variáveis de naturezas distintas obedecem a distribuições de probabilidade e estruturas de variância distintas (Olsson 2002), os modelos utilizados deverão lançar mão de técnicas capazes de acomodar estes desvios das premissas.

Um último ponto importante a se observar antes de tratar da análise em si são as escalas de coleta e de réplica de cada uma das variáveis respostas. Exceto quando claramente explicitado, a unidade de réplica verdadeira básica proposta neste projeto é o sítio amostral (fragmento florestal alvo ou referência, ilhas fluviais, restingas), e as análises, portanto devem seguir esta unidade para atender à premissa de independência das observações. Como grupos biológicos distintos têm história de vida e capacidade de dispersão distintas, ainda que tenha sido proposto um desenho teoricamente espacializado de forma a garantir independência, esta deve ser avaliada através de uma análise de autocorrelação espacial entre as amostras. Dentre as várias técnicas possíveis, recomenda-se o uso dos chamados “*Distance-based Moran’s eigenvector maps (dbMEM)*”, anteriormente conhecidos por PCNMs, descritos no capítulo 14 de Legendre & Legendre (2012), implementados no pacote *adespatial* em R. Os eixos significativos da dbMEM podem também ser incluídos nos modelos propostos a fim de se considerar a estrutura espacial como variável.

Em seguida, serão apresentados os protocolos de análises para as perguntas principais deste plano de monitoramento:

1) Análises para levantamento da suficiência amostral e riqueza de espécies

Para a amostragem das comunidades biológicas, ao final de cada campanha de coleta deve ser feita a curva de acúmulo de espécies para cada grupo em função das unidades amostrais trabalhadas. Ao longo das campanhas, estas curvas devem ser atualizadas. Este procedimento tem como objetivo fornecer aos órgãos ambientais, tomadores de decisão e cientistas uma noção do tamanho da lacuna amostral que ainda existe na Bacia. Estas funções são implementadas pelos pacotes *vegan* (Oksanen et al. 2019) e *iNEXT* (Chao et al. 2014) em R.

Para o cálculo da riqueza de espécies, de acordo com o protocolo proposto para os diferentes grupos, poderá ser utilizada como métrica de riqueza de espécies:

1. a densidade de espécies (relatório FBDS 2020), isto é, o número bruto de espécies acumulado por ponto amostral para o grupo, sendo que sabidamente este representará a riqueza das espécies no local influenciada pelas distribuições de abundâncias encontradas (Gotelli & Colwell 2001).
2. a rarefação da riqueza de espécies em função do acúmulo de indivíduos (Chao et al. 2014).
3. a riqueza de espécies através de números equivalentes (Hill 1973, Jost 2007). Este procedimento permite estimar a riqueza de espécies para as espécies total de uma amostra ($q=0$) e a riqueza de espécies diminuindo a importância das espécies com menor abundância na amostra ($q=1$)

2) Métrica de composição de espécies

Para se avaliar a variação na composição de espécies entre as áreas e entre os diferentes tempos do monitoramento, deverá ser utilizada a métrica de diversidade beta, como diversidade gama/diversidade alfa (Whittaker 1972). Neste caso, diversidade gama é a riqueza acumulada de espécies na escala espacial/temporal e diversidade alfa é a riqueza de espécies na escala espacial/temporal menor (Tuomisto 2010). A razão entre a diversidade nestas escalas fornece uma métrica da diferença na composição de espécies

naquela escala. A diversidade beta pode ser calculada em várias escalas ecológicas e, no caso deste estudo poderá ser calculada, a depender da escala da pergunta específica:

1. por fragmento (ou trecho de rio) para fornecer uma medida de mudança na composição interna do fragmento (medida de homogeneização taxonômica, Solar et al. 2015). Neste caso, a diversidade alfa é a riqueza em cada unidade amostral (transecto/parcela) e a diversidade gama a riqueza acumulada do fragmento. A diversidade beta fornece uma medida da heterogeneidade de cada réplica.
2. entre fragmentos da mesma classe (p. ex. entre fragmentos alvo e entre referência), de maneira a se obter a diferença na composição de espécies entre os diferentes tratamentos. Neste caso, a diversidade beta deve ser calculada entre todos os pares possíveis de fragmentos do nível do tratamento. A diversidade alfa é a riqueza em cada fragmento do tipo (alvo/referência) e a diversidade gama a riqueza acumulada em cada par de fragmentos nível do tratamento (p. ex. dois fragmentos alvo). A diversidade beta fornece uma medida da heterogeneidade da composição de espécies entre alvo e referência ao longo da bacia, permitindo a análise da heterogeneidade da composição de espécies.
3. entre tempos distintos dos mesmos fragmentos, de maneira a se obter a heterogeneidade da composição de espécies ao longo do tempo de recuperação (ver Nunes et al. 2020). Neste caso, a diversidade beta deve ser calculada direcionalmente entre os pares temporais amostrados, seguindo o gradiente de passagem do tempo. A diversidade alfa é a riqueza em cada ano do fragmento e a diversidade gama a riqueza acumulada em cada par de tempos dos fragmentos (p. ex. 1º e 2º anos, 1º e 3º anos, etc). A diversidade beta fornece uma medida da heterogeneidade temporal da composição de espécies entre alvo e referência ao longo da bacia, permitindo a análise da heterogeneidade da composição de espécies.

As métricas de diversidade beta fornecem uma medida mais precisa da mudança de composição de espécies do que as análises multivariadas, pois permitem a comparação desta diversidade entre múltiplas escalas espaciais e temporais ao longo do estudo. É importante destacar que a validade das comparações entre as métricas de diversidade beta está bastante atrelada ao balanceamento das amostras obtidas. Se por qualquer motivo houver desbalanceamento entre as amostras, sugere-se proceder uma rarefação das áreas para o cálculo da diversidade beta, tendo como linha de base a área com menor número de amostras (ver Solar et al. 2015 para mais detalhes do procedimento).

3) Análises com o objetivo de responder à pergunta de qual o efeito espacial do rompimento da barragem de Fundão – comparação das métricas obtidas entre os fragmentos alvo e referência ao longo da calha do rio dentro de um mesmo ano de amostragem.

As análises dessa pergunta partem do pressuposto que se quer saber o efeito do contato (atual ou pretérito) das áreas afetadas com o rejeito. Este conjunto de análises também deverá ser usado para entender o impacto espacial da restauração ambiental, levando-se em conta o desenho espacializado para abranger áreas de restauração em diferentes cenários em relação ao rejeito. Para tal, a análise deverá lançar mão do uso de Modelos Lineares Generalizados (GLMs, Olsson 2002, Crawley 2012) onde a variável resposta será a métrica a ser obtida indicada por cada especialista (p.ex. riqueza de espécies, concentração de contaminantes, etc) e a variável explicativa será a categoria de impacto (alvo ou referência). De acordo com as hipóteses propostas

pelos protocolos de cada grupo, poderão ser usadas co-variáveis no modelo (solo, clima, vegetação, etc). É necessário observar-se, antes de construir o modelo qual é a natureza da variável resposta, de forma a se adequar a natureza da variável com a distribuição de probabilidades adequada, acompanhada de sua função de ligação específica (Olsson 2002, Crawley 2012). De maneira geral, pode-se adotar algumas situações de exemplo de escolha da distribuição de probabilidade para referência (mas veja fig. 4.1 de Olsson et al. 2002 para uma explicação completa). A escolha da distribuição é teórica e, portanto, após a construção do mesmo é necessário fazer a checagem através da análise de resíduos (capítulo 9, Crawley et al. 2012, pacote DHARMA do software R - <https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA/vignettes/DHARMA.html>).

1. se a medida da variável é contínua, podendo assumir qualquer valor e com distribuição de erros homogênea (como por exemplo, medida de tamanho), a distribuição escolhida deverá ser Normal.
2. se a variável for de contagem, assumindo apenas valores inteiros e maiores que zero (p.ex. riqueza de espécies), deve-se optar por uma distribuição Poisson. Para modelos, como Poisson, onde se assume uma relação linear entre a média e a variância (ou seja, calcula-se a variância a partir da média, Olsson 2012), é necessário checar para a sobredispersão (Crawley 2012). Caso haja desvio do parâmetro de dispersão, é necessário adotar-se uma nova distribuição adequada, que no caso dos dados de contagem é a Binomial Negativa ou *quasi*Poisson. As distribuições Poisson, Binomial Negativa e *quasi*Poisson utilizam a função de ligação *log*, devendo esta ser observada quando da plotagem dos dados.
3. se a variável envolver estados binários (presente/ausente, vivo/morto) ou probabilidades a variável tem uma contenção forçada entre 0 e 1, devendo-se, portanto, adotar uma distribuição de probabilidades que acomode esta característica. Neste caso, deve-se adotar a distribuição Binomial, que é capaz de acomodar a estrutura de erros dos dados binários. Similar à distribuição Poisson, também esperamos que o parâmetro de dispersão do modelo seja igual a 1. Caso haja desvio do mesmo, é necessário adotar-se uma nova distribuição adequada, que no caso dos dados binários é a *quasi*Binomial. As distribuições Binomial e *quasi*Binomial utilizam a função de ligação *logit*, devendo esta ser observada quando da plotagem dos dados.
4. se a variável envolver a sobrevivência (mudança de estado) no tempo entre fragmentos (p. ex. predação de lagartas artificiais), deve-se adotar o procedimento de análise de sobrevivência, através de distribuição de Weibull ou Exponencial (Crawley 2012, Cap. 27). Este tipo de análise permite avaliar com bastante robustez as diferenças entre tratamento no “tempo para morte”, sendo considerada morte qualquer mudança de estado de uma variável (no exemplo das lagartas, de integras para predadas). Outra grande vantagem desta análise é que as amostras que sobreviverem até o final do experimento, ou aquelas amostras que foram perdidas podem ter sua informação registrada como “último momento vistas intactas”, através da informação de censor nos dados. Neste tipo de modelo, caso a unidade de medida seja menor que a unidade de réplica, deve-se adotar o procedimento de “frailty”, informando ao modelo qual é a verdadeira unidade de réplica para que a significância possa ser devidamente calculada.

Em relação à construção do modelo, quando a unidade de observação da métrica for menor do que a unidade de réplica – por exemplo, se cada fragmento tem 3 transectos e cada transecto gera uma medida na tabela de dados – deve-se lançar mão dos Modelos Lineares Generalizados Mistos para considerar esta

pseudoreplicação (*sensu* Hurlbert 1984) criada nos dados (Bolker 2009; <https://bbolker.github.io/mixedmodels-misc/glmmFAQ.html>). Estes modelos permitem informar tanto efeitos fixos (variáveis que são medidas), quanto efeitos aleatórios (variáveis que não são medidas, mas de influência conhecida), como por exemplo a identidade do fragmento que agrupa as observações. Este procedimento permite ao modelo entender que medidas tomadas dentro do mesmo fragmento têm estrutura de variâncias distintas àquelas esperadas para amostras verdadeiramente independentes (Silk et al. 2020). Os GLMMs são implementados em R por vários pacotes, incluindo o pacote *lme4*. Quando a unidade de observação da métrica for a mesma da unidade de réplica, isto é, quando a variável resposta for medida na escala do fragmento, não é necessário usar os GLMMs, bastando utilizar os GLMs. Todavia, em ambos os casos é mandatória a checagem dos modelos, através de análise de resíduos, como mencionado acima (capítulo 9, Crawley et al. 2012, pacote DHARMA do software R – <https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA/vignettes/DHARMA.html>).

Em resumo, a análise dos dados para esta pergunta deverá relacionar as métricas indicadoras propostas nos protocolos de cada grupo como variável resposta e a variável explicativa será a categoria de impacto (alvo ou referência). Os modelos devem ser construídos através de Modelos Lineares Generalizados ou Modelos Lineares Generalizados Mistos, optando-se pela distribuição de probabilidades adequada. No caso das ações de restauração, uma comparação necessária é entre as métricas das parcelas permanentes e das parcelas sorteadas. Nesta situação, é importante ressaltar que o esperado é que não haja diferença significativa entre métricas de parcelas permanentes e parcelas sorteadas (i.e., todas as áreas estão sendo restauradas com igual eficiência). Todos os modelos devem ser criticados através de análise de resíduos e ter todas as suas premissas então checadas. Para as métricas de estrutura de comunidades (riqueza, abundância e composição – diversidade beta, *sensu* Whittaker 1972); comuns à maioria dos grupos biológicos amostrados nos mesmos fragmentos, sugerimos uma análise multitaxa, com todos os grupos em uma mesma análise. Naturalmente, todas as padronizações necessárias nas medidas devem ser adotadas.

Em termos gerais, as expectativas e observações são similares às da análise espacial. No caso das ações de restauração, uma comparação necessária é entre as métricas das parcelas permanentes e das parcelas sorteadas. Nesta situação, é importante ressaltar que o esperado é que não haja diferença significativa entre métricas de parcelas permanentes e parcelas sorteadas (i.e., todas as áreas estão sendo restauradas com igual eficiência). Temporalmente, ainda que se saiba da existência de variação nas trajetórias de restauração naturais (Norden et al. 2015), é esperado que as áreas tenham trajetórias comuns no sentido da melhoria da condição florestal das áreas sob restauro, uma vez que medidas ativas estão sendo tomadas neste sentido. Todos os modelos devem ser criticados através de análise de resíduos e ter todas as suas premissas então checadas. Para as métricas de estrutura de comunidades (riqueza, abundância e composição – diversidade beta, *sensu* Whittaker 1972); comuns à maioria dos grupos biológicos amostrados nos mesmos fragmentos, sugere-se uma análise multitaxa, com todos os grupos em uma mesma análise. Naturalmente, todas as padronizações necessárias nas medidas devem ser adotadas.

4) Análises com o objetivo de responder à pergunta de qual o efeito espaço-temporal do rompimento da barragem de Fundão – avaliação da evolução temporal dos padrões observados nos fragmentos amostrados ao longo da calha do rio.

As análises dessa pergunta partem do pressuposto que se quer saber o efeito do contato (atual ou pretérito)

das áreas afetadas com o rejeito ao longo das amostragens feitas no tempo (série temporal). Esta análise também tem por objetivo entender a evolução temporal da paisagem e das ações de restauração na bacia. Para tal, a análise deverá lançar mão de análises de séries temporais. Todavia, considerando que pela urgência das respostas já é preciso ter respostas com séries temporais pequenas, sugere-se a aplicação dos Modelos de Séries Temporais Interrompidas (English 2019, pacote R *its.analysis*) onde a variável resposta será a métrica a ser obtida indicada por cada especialista (p.ex. riqueza de espécies, concentração de contaminantes, etc) e a variável explicativa será a categoria de impacto (alvo ou referência).

Outra possibilidade, complementar às análises de séries temporais, é a de se fazer a comparação das métricas através de GLMMs (ver seção anterior), com a métrica indicadora como variável resposta; categoria do tratamento (alvo ou referência) e ano de amostragem como variáveis explicativas e a identidade do fragmento amostrado como variável aleatória. Em termos das distribuições de erros e premissas das análises a serem adotadas, verificar a seção anterior.

Curadoria dos dados

Todos os dados coletados neste plano de monitoramento pelos grupos de trabalho deverão ser armazenados e disponibilizados em seu formato mais detalhado possível. Ou seja, os dados devem ser disponibilizados na escada de indivíduos coletados, quando possível, ou na escala da menor unidade de coleta (p. ex. armadilha). Os dados devem ser armazenados em formatos que permitam a sua abertura em qualquer software gratuito (p. ex. ".csv", ".txt", ".xlsx"). Deverá ser adotado para nomenclatura de colunas dos dados o padrão de termos Darwin Core, já bastante estabelecidos e adotados pelo sistema SiBBR- (<https://bit.ly/2V6CEcA>). Este formato garantirá a plena compatibilidade entre os bancos de dados gerados neste plano de monitoramento com os bancos de dados públicos. Além da compatibilidade, a transformação deste banco de dados em um formato de tabela analítica de dados é direto e pode ser realizado em qualquer programa livre de análise de dados (p. ex. Libre Office e R).

O banco de dados deve ter curadoria específica de um profissional experiente, sendo periodicamente validados através de um planejamento de conferência e *backup* dos mesmos. Considerando o volume de dados já coletados e que será ainda obtido, sugere-se que a Fundação Renova trabalhe no desenvolvimento de uma estrutura de banco de dados própria. Este banco de dados deve ser capaz de garantir a congruência e estrutura do banco de dados a longo prazo. Também é desejável que este banco de dados seja integralmente compatível com os bancos de dados públicos.

8. BIBLIOGRAFIA

Abreu, C.R.M. & Vieira, M.F. 2004. Os beija-flores e seus recursos florais em um fragmento florestal de Viçosa, sudeste brasileiro. *Lundiana*, 5: 129-134.

Adamski P, Witkowski J 2002 Increase in fluctuating asymmetry during a population extinction: the case of the apollo butterfly *Parnasius apollo* in the Pieniny Mts. *Biol Bratis* 57: 597-601.

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126

Afonso TF, Demarco CF, Pieniz S, Quadro MS, Camargo FA, Andrezza R 2020 Bioprospection of indigenous flora grown in copper mining tailing area for phytoremediation of metals. *Journal of Environmental Management* 256: 109953.

Aleixo, A. & Vielliard, J.M.E. 1995. Composição e dinâmica da avifauna da Mata de Santa Genebra, Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 12: 493-511.

Aleixo, A. 1995. Aves da Mata de Santa Genebra: lições para a conservação de fragmentos florestais. In: Morellato, P.C. & Leitão-Filho, H.F. eds. *Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra*. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, p. 83-86.

Aleixo, A. 1999. Effects of selective logging on a bird community in the Brazilian Atlantic Forest. *The Condor*, 101: 537-548.

Aleixo, A. 2001. Conservação da avifauna da Floresta Atlântica: efeitos da fragmentação e a importância de florestas secundárias. In: Albuquerque, J.L.B.; Cândido Jr, J.F.; Straube, F.C. & Roos, A.L. eds. *Ornitologia e conservação: da ciência às estratégias*. Tubarão: Editora Unisul, p. 199-206.

Alexandrino, E.R.; Buechley, E.R.; Piratelli, A.J.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Moral, R.A.; Şekercioğlu, C.H.; Silva, W.R. & Couto, H.T.Z. 2016. Bird sensitivity to disturbance as an indicator of forest patch conditions: an issue in environmental assessments. *Ecological Indicators*, 66: 369-381.

Alford RA, Richards SJ, McDonald KR 2007 Biodiversity of Amphibians. Pages1–12 In: Levin SA ed. *Encyclopedia of Biodiversity*, 2ª edition. Academic Press.

Ali H, Khan E 2019 Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs - Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 25: 1353 – 1376.

Alvarenga AS, Silveira FA, SantosJE, Novais SMA, Quesada M, Neves FS 2020 Vegetation composition and structure determine wild bee communities in a tropical dry forest. *Journal of Insect Conservation* 24:487-498

Alves, R.S.C. 2020. Efeito da quantidade de floresta na predação de sementes e frugivoria em diferentes tipos de ambientes. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brazil.

Alves-Costa, C.P. & Lopes, A.V. 2001. Using artificial fruits to evaluate fruit selection by birds in the field. *Biotropica*, 33:713-717.

Alves-dos-Santos I, Silva CI, Pinheiro M, Kleinert AMP 2016 Quando um visitante floral é um polinizador? *Rodriguésia* 67: 295-307.

Alves-Silva E, Santos JC, Cornelissen TG 2018 How many leaves are enough? The influence of sample size on estimates of plant developmental instability and leaf asymmetry. *Ecological Indicators* 89:912-924.

Ampla Engenharia. 2017 Relatório de Impacto Ambiental - RIMA - EIA Integrado do Complexo Germano. Ampla Engenharia e Gestão de Projetos Ltda, Belo Horizonte.

ANA Agência Nacional de Águas. 2016. Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce. Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil. Informe 2015. 49pp. Disponível em: http://arquivos.ana.gov.br/RioDoce/EncarteRioDoce_22_03_2016v2.pdf.

Andersen AN 2019 Responses of ant communities to disturbance: five principles for understanding the disturbance dynamics of a globally dominant faunal group. *Journal of Animal Ecology* 88:350-362.

Andersen AN, Hoffmann BD, Müller WJ, Griffiths AD 2002. Using ants as bioindicators in land management: simplifying assessment of ant community responses. *Journal of Applied Ecology* 39: 8-17.

Andrén, Henrik. Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat: A Review. *Oikos*, v. 71, n. 3, p. 355–366, 1994.

Anjos, L. 2001a. Bird communities in five Atlantic forest fragments in southern Brazil. *Ornitología Neotropical*, 12: 11-27.

Anjos, L. 2001b. Comunidades de aves florestais: implicações na conservação. In: Albuquerque, J.L.B.; Cândido Jr, J.F.; Straube, F.C. & Roos, A.L. eds. *Ornitologia e conservação: da ciência às estratégias*. Tubarão: Editora Unisul, p. 17-37.

Anjos, L. 2006. Bird species sensitivity in a fragmented landscape of the Atlantic Forest in southern Brazil. *Biotropica*, 38: 229-234.

Anjos, L.; Bochio, G.M.; Campos, J.V.; McCrate, G.B. & Palomino, F. 2009. Sobre o uso de níveis de sensibilidade de aves à fragmentação florestal na avaliação da integridade biótica: um estudo de caso no norte do estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 17: 28-36.

Anjos, L.; Collins, C.D.; Holt, R.D.; Volpato, G.H.; Mendonça, L.B.; Lopes, E.V.; Boçon, R.; Bisheimer, M.V.; Serafini, P.P. & Carvalho, J. 2011. Bird species abundance-occupancy patterns and sensitivity to forest fragmentation: implications for conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 144: 2213-2222.

Anjos, L.; Holt, R.D. & Robinson, S. 2010. Position in the distributional range and sensitivity to forest fragmentation in birds: a case history from the Atlantic Forest, Brazil. *Bird Conservation International*, 20: 392-399.

Anjos, L.; Zanette, L. & Lopes, E.V. 2004. Effects of fragmentation on the bird guilds of the Atlantic Forest in north Paraná, southern Brazil. *Ornitologia Neotropical*, 15: 137-144.

Anjos, L.A. 2007. A eficiência do método de amostragem por pontos de escuta na avaliação da riqueza de aves. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 15: 239-243.

Anne Chao, Nicholas J. Gotelli, T. C. Hsieh, Elizabeth L. Sander, K. H. Ma, Robert K. Colwell, and Aaron M. Ellison 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* 84:45-67.

Arauco LRR, De Stéfani MV, Nakaghi LSO, Oliveira-Bahia VRL. 2007. Histologia do rim, fígado e intestino de girinos de rã-touro *Rana catesbeiana* alimentados com dietas contendo própolis. *Ciência Rural*, 37:1436-1441.

Arruda, R.; Rodrigues, D.J. & Izzo, T.J. 2008. Rapid assessment of fruit-color selection by birds using artificial fruits at local scale in Central Amazonia. *Acta Amazonica*, 38:291-296.

Babini MS, Bionda CL, Salas NE, Martino AL 2015. Health status of tadpoles and metamorphs of *Rhinella arenanum* Anura, Bufonidae that inhabit agroecosystems and its implications for land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 118: 118–125.

Baccaro FB, Feitosa RM, Fernandez F, Fernandes IO, Izzo TJ, Souza JLP, Solar R 2015. Guia para os gêneros de formigas do Brasil. Manaus: Editora Inpa, 2015. 388 p.

Baldwin, S.P.; Oberholser, H.C. & Worley, L.G. 1931. Measurements of birds. Scientific Publications of the Cleveland Museum of Natural History, 5:1-164.

Banks-Leite, C., Pardini, R., Tambosi, L. R., Pearse, W. D., Bueno, A. A., Bruscatin, R. T., Condez, T.H., Dixo, M., Igari, A.T., Martensen, A.C. & Metzger, J. P. 2014. Using ecological thresholds to evaluate the costs and benefits of set-asides in a biodiversity hotspot. *Science*, 345:6200, 1041-1045.

Banks-Leite, Cristina; Pardini, Renata; Tambosi, Leandro R; et al. Using ecological thresholds to evaluate the costs and benefits of set-asides in a biodiversity hotspot. *Science*, v. 345, n. 6200, p. 1041–1045, 2014.

Barber NA 2012 Clay caterpillars: a tool for ecology and evolution labs. *The American Biology teacher* 74: 513-517.

Barbosa, K.V.C.; Knogge, C.; Develey, P.F.; Jenkins, C.N. & Uezu, A. 2017. Use of small Atlantic Forest fragments by birds in southeast Brazil. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 15: 42-46.

Beasley DAE, Bonisoli-Alquati A, Mousseau TA 2013 The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. *Ecological Indicators* 30:218-226.

Beebee TJC, Griffiths RA 2005 The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biology Conservation* 125: 271–285.

Beirão MV, Neves FS, Penz CM, DeVries PJ and Fernandes GW 2017 High butterfly beta diversity between Brazilian cerrado and cerrado–caatinga transition zones. *Journal of Insect Conservation* 21: 849–860.

Beltrame, T. P.; Rodrigues, E. 2007. Feijão guandu *Cajanus cajan* L. Millsp. na restauração de florestas tropicais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 1, p. 19-28.

Benadi G, Hovestadt T, Poethke H, Blüthgen N. 2014 Specialization and phenological synchrony of plant-pollinator interactions along an altitudinal gradient. *Journal of Animal Ecology* 83: 639-650.

Benayas, JMR, Newton, AC, Diaz, A, Bullock, JM. 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta analysis. *Science* 325, 1121.

Bencke, G.A.; Maurício, G.N.; Develey, P.F. & Goerck, J.M. 2006. Áreas importantes para a conservação das aves no Brasil: parte I - estados do domínio da Mata Atlântica. São Paulo: SAVE Brasil, 494 p.

Bestelmeyer BT, Agosti D, Alonso LE, Brandão CR, Brown JR WL, Delabie JHC, Silvestr R 2000 Field Techniques for the Study of Ground-Dwelling Ants. In: Agosti D, Majer JD, Alonso LE and Schultz TR Eds. *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Washington and London: Smithsonian Institution Press, p.122-144.

Bibby, C.; Jones, M. & Marsden, S. 1998. Expedition field techniques: bird surveys. Londres: Royal Geographical Society, 136 p.

Bibby, C.J.; Burgess, N.D. & Hill, D.A. 1992. Bird census techniques. Londres: Academic Press, 302 p.

Bibby, C.J.; Burgess, N.D.; Hill, D.A. & Mustoe, S. 2000. Bird census techniques, 2nd ed. Academic Press, Londres.

Bicho Do Mato & Fundação Renova. 2020 Plano de Ação para Conservação da Biodiversidade Terrestre do Rio Doce. Bicho do Mato e Fundação Renova, Belo Horizonte.

Bicho do Mato Meio Ambiente 2019. Avaliação dos impactos e monitoramento da fauna e flora terrestres nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Relatório Anual. Belo Horizonte, Minas Gerais.

Bioflora – Tecnologia da Restauração. 2015. Manual de restauração ecológica técnicos e produtores rurais no extremo sul da Bahia.

BirdLife-International. 2020. Data Zone. Disponível em: <<http://datazone.birdlife.org/home>>. Acesso em: 14 Novembro 2020.

Boechat CL, Pistóia VC, Gianelo C, de Oliveira Camargo FA 2016 Accumulation and translocation of heavy metal by spontaneous plants growing on multi-metal-contaminated site in the Southeast of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 2371-2380.

Boesing, Andrea Larissa; Nichols, Elizabeth; Metzger, Jean Paul. Biodiversity extinction thresholds are modulated by matrix type. *Ecography*, p. 1520–1533, 2018.

Bornschein, M.R. & Reinert, B.L. 2000. Aves de três remanescentes florestais do norte do estado do Paraná, Sul do Brasil, com sugestões para a conservação e manejo. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17: 615-636.

Bose S, Bhattacharyya A 2008 Heavy metal accumulation in wheat plant grown in soil amended with industrial sludge. *Chemosphere* 70:1264–1272

BPBES & IIS, 2019a. Sumário para tomadores de decisão: relatório temático sobre restauração de paisagens e ecossistemas. Renato Crouzeilles, Ricardo R. Rodrigues & Bernardo B.N. Strassburg editores. São Carlos São Paulo: Editora Cubo, 20p. Em: https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2019/10/SPM_RestauracaoVF_ebook.pdf.

BPBES & IIS, 2019b. Relatório Temático sobre Restauração de Paisagens e Ecossistemas. Crouzeilles, R., Rodrigues R.R., Strassburg B.B.N editores. São Carlos São Paulo: Editora Cubo, 40p. <https://doi.org/10.4322/978-85-60064-91-5>. Em https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2019/10/Relatorio_Restauracao_VF.pdf

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-74.

Braga RF, Korasaki V, Andresen E, Louzada J 2013 Dung Beetle Community and Functions along a Habitat-Disturbance Gradient in the Amazon: A Rapid Assessment of Ecological Functions Associated to Biodiversity. *PLoS One* 8: e57786.

Brançalion, P H S, D Schweizer, U Gaudare, J R Mangueira, F Lamonato, F T Farah, A G Nave, R R Rodrigues. 2016. Balancing economic costs and ecological outcomes of passive and active restoration in agricultural landscapes: The case of Brazil. *Biotropica* 48:856-867.

Brançalion, P.H.S.; Meli, P.; Tymus, J.R.C.; Lenti, F.E.B.; Benini, R.M.; Silva, A.P.M.; Isernhagen, I.; Holl, K.D. 2019. What makes ecosystem restoration expensive? A systematic cost assessment of projects in Brazil. *Biological Conservation*, v. 240. 108274.

Brançalion, PHS, Bongor, F, Rodrigues, RR, Molin, PG, Poorter, L, Peña Claros, M, 2019. Understanding restored forests for benefiting people and nature – “NewFor”. Research Proposal Form: Joint Research Projects The Atlantic forest. FAPESP/NWO.

Brançalion, PHS; Gandolfi, S; Rodrigues, RR 2015. Restauração Florestal. São Paulo: Oficina de Textos, 431p.

BRASIL. LEI Nº 12.651, DE 25 DE MAIO DE 2012. 2016. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm.

Brasileiro Filho G. 1998. *Bogliolo Patologia Geral*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 312 p.

Brooks, T. & Balmford, A. 1996. Atlantic forest extinctions. *Nature*, 380: 115.

Brooks, T.; Tobias, & J. Balmford, A. 1999. Deforestation and bird extinctions in the Atlantic Forest. *Animal Conservation*, 2: 211-222.

Brown-Jr KS, Freitas AVL 2000 Atlantic Forest butterflies: indicators for landscape conservation. *Biotropica* 32:934-956.

Buege JA, Aust SD 1978 Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310.

Bullock JM, Aronson J, Newton AC, Pywell RF, Rey-Benayas JM 2011 Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution* 26:541-549.

Bustamante MMC, Silva JS, Scariot A, Sampaio AB, Vieira DLM, Garcia E, Sano E, Fernandes GW, Durigan G, Roitman I, Figueiredo I, Rodrigues RR, Pillar VD, Oliveira AO, Malhado AC, Alencar A, Vendramini A, Padovezi A, Carrascosa H, Freitas J, Siqueira JÁ, Shimbo J, Generoso LG, Tabarelli M, Biderman R, Salomão RP, Valle R, Junior B, Nobre C 2019 Ecological restoration as a strategy for mitigating and adapting to climate change: lessons and challenges from Brazil. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 24: 1249-1270.

Cáceres, N.C.; Prates, L.Z.; Ghizoni-Júnior, I. R. & Graipel, M.E. 2009. Frugivory by the black-eared opossum *Didelphis aurita* in the Atlantic Forest of southern Brazil: Roles of sex, season and sympatric species. *Biotemas*, 22:203-211.

Cagle FR 1939. A system of marking turtles for future identification. *Copeia* 1939: 170-173.

Camargo, N. F. D., Machado, R. & Cruz, S. 2011. Frugivoria e potencial de dispersão de sementes pelo marsupial *Gracilinanus agilis* Didelphidae : Didelphimorphia em áreas de Cerrado no Brasil central. *Acta Botanica Brasilica*, 25:646–656.

Campos LAO, Silveira FA, Oliveria ML, Abrantes CVM, Morato EF and Melo GAR 1989 Utilização de armadilhas para a captura de machos de Euglossini Hymenoptera, Apoidea. *Revista Brasileira de Zoologia* 6: 621-626.

Campos-Silva, L.A. & Piratelli, A.J. 2020. Vegetation structure drives taxonomic diversity and functional traits of birds in urban private native forest fragments. *Urban Ecosystems*, 23: <https://doi.org/10.1007/s11252-020-01045-8>.

Cantor, M.; Piccinini, C. M. P.; Silva, W. R. & Setz, E. Z. F. 2007. A contribuição de *Didelphis albiventris* Marsupialia, Didelphidae para a dispersão de sementes em um fragmento florestal urbano. VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, MG.

Carstensen DW, Sabatino M, Trøjelsgaard K, Morellato LPC 2014 Beta diversity of plant- pollinator networks and the spatial turnover of pairwise interactions. *PLoS ONE* 9: e112903.

Castro FS, DaSilva PG, Solar R, Fernandes GW, Neves FS 2020 Environmental drivers of taxonomic and functional diversity of ant communities in a tropical mountain, *Insect Conservation and Diversity* 13: 393-403.

Cazetta, E.; Schaefer, H.M. & Galetti, M. 2009. Why are fruits colorful? The relative importance of achromatic and chromatic contrasts for detection by birds. *Evolutionary Ecology*, 23:233-244.

Cetesb. 2014 Manual para elaboração de estudos para o licenciamento com avaliação de impacto ambiental. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, São Paulo.

Chamberlain SA, Bronstein JL, Rudgers JA 2014 How context dependent are species interactions? *Ecology Letters* 17:881-890.

Chase JM, Blowes SA, Knight TM, Gerstner K, May F 2020 Ecosystem decay exacerbates biodiversity loss with habitat loss. *Nature* in press.

Chazdon RL, Chao A, Colwell RK, Lin S-Y, Norden N, Letcher SG, Clark DB, Finegan B, Arroyo JP 2011 A novel statistical method for classifying habitat generalists and specialists. *Ecology* 92: 1332-1343.

Chenson p, huntly n 1997 The roles of harsh and fluctuating conditions in the dynamics of ecological communities. *The American Naturalist* 150: 519-553.

Christiansen, M.B. & Pitter, E. 1997. Species loss in a forest bird community near Lagoa Santa in southeastern Brazil. *Biological Conservation*, 80: 23-32.

Christou A, Theologides CP, Costa C, Kalavrouziotis IK, Varnavas, SP 2017 Assessment of toxic heavy metals concentrations in soils and wild and cultivated plant species in Limni abandoned copper mining site, Cyprus. *Journal of Geochemical Exploration* 178: 16-22.

Coelho DG, Marinato CS, Matos LP, Andrade HM, da Silva VM, Neves PHS, Oliveira JÁ 2020 Evaluation of heavy metals in soil and tissues of economic-interest plants grown in sites affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 00: 1–12.

Coelho DG, Marinato CS, Matos LP, Andrade HM, Silva VM, Neves PHS, Oliveira JA 2020 Evaluation of metals in soil and tissues of economic-interest plants grown in sites affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. *Integr Environ Assess Manag.* doi: 10.1002/ieam.4253

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA No 420/2009. 2009, p. 81–84.

Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrel AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL 2013 What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation Physiology* 1:1-23.

COPAM 2010. Deliberação Normativa COPAM n° 147, de 30 de abril de 2010. Aprova a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: Diário do Executivo de Minas Gerais, 4 maio 2010. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=13192>>. Acesso em: 17 de novembro de 2020.

Costa HC, Rezende DT, Molina FB, Nascimento LB, Leite FSF, Fernandes APB 2015. New distribution records and potentially suitable areas for the threatened snake-necked turtle *Hydromedusa maximiliani* Testudines: Chelidae. *Chelonian Conservation and Biology* 14: 88 – 94.

Crespo-Pérez V, Kazakou E, Roubik DW and Cárdenas RE 2020 The importance of insects on land and in water: a tropical view. *Current Opinion in Insect Science* 40: 31-38.

Crouzeilles R, Santiami E, Rosa M, Pugliese L, Brancalion PHS, Rodrigues RR, Metzger JP, Calmon M, Scaramuzza CaDM, Matsumoto MH, Padovezi A, Benini RDM, Chaves RB, Metzker T, Fernandes RB, Scarano FR, Schmitt J, Lui G, Christ P, Vieira RM, Senta MMD, Malaguti GA, Strassburg BBN, Pinto S 2019 There is

hope for achieving ambitious Atlantic Forest restoration commitments. *Perspectives in Ecology and Conservation* 17:80-83.

D'Angelo-Neto, S.; Venturin, N.; Oliveira-Filho, A.T. & Costa, F.A.F. 1998. Avifauna de quatro fisionomias florestais de pequeno tamanho 5-8 ha no campus da UFLA. *Revista Brasileira de Biologia*, 58: 463-472.

Da Silva Cruz FV, Gomes MP, Bicalho EM, Della Torre F, Garcia QS 2020 Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest?. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189: 110021.

Dalsgaard, B.; Gonzalez, A.M.; Olesen, J.M.; Timmermann, L.H. & Ollerton, J. 2008. Pollination networks and functional specialization: A test using Lesser Antillean plant-hummingbird assemblages. *Oikos*, 117:789-793.

Davis ALV, Scholtz CH, Philips TK 2002 Historical biogeography of scarabaeine dung beetles. *Journal of Biogeography* 29:1217-1256.

De Almeida DRA, Stark SC, Valbuena R, Broadbent EN, Silva TSF, De Resende AF, Ferreira MP, Cardil A, Silva CA, Amazonas N, Zambrano AMA, Brancalion PHS 2020 A new era in forest restoration monitoring. *Restoration Ecology* 28:8-11

De Almeida, D. R. A., E. N. Broadbent, A. M. A. Zambrano, B. E. Wilkinson, M. E. Ferreira, R. Chazdon, P. Meli, E. B. Gorgens, C. A. Silva, S. C. Stark, R. Valbuena, D. A. Papa, and P. H. S. Brancalion. 2019. Monitoring the structure of forest restoration plantations with a drone-lidar system. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 79:192-198.

De Fátima Esteves G, Bressanin LA, de Souza KRD, da Silva AB, Mantovani JR, Marques DM, de Souza TC 2020 Do tailings from the Mariana, MG Brazil, disaster affect the initial development of millet, maize, and sorghum? *Environmental Science and Pollution Research*: 1-12.

Defilipo BV, Ribeiro AC 1997 *Análise química do solo – Metodologia*. 2nd ed. Viçosa BR: 26 p

Del Hoyo, J.; Elliott, A.; Sargatal, J.; Christie, D.A. & de Juana, E. 2020. *Birds of the world*. Ithaca: Cornell Lab of Ornithology. Disponível em: <<https://birdsoftheworld.org/>>. Acesso em: 4 de agosto de 2020.

Devictor V, van Swaay C, Brereton T, Brotons L, Chamberlain D, Heliölä J, Herrando S, Julliard R, Kuussaari M, Lindström A, Reif J, Roy DB, Schweiger O, Settele J, Stefanescu C, van Strien A, van Turnhout C, Vermouzek Z, Wallis de Vries MF, Wynhoff I, Jiguet F 2012 Differences in the climatic debts of birds and butterflies at a continental scale. *Nature Climate Change* 2:121-124.

DeVries PJ 1988. Stratification of fruit-feeding nymphalid butterflies in a Costa Rican rainforest. *Journal of Research on the Lepidoptera*. 26:98-108.

DeVries, P. J. 1987. *Butterflies of Costa Rica and their natural history: Papilionidae, Pieridae, Nymphalinae* vol. 1. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Díaz, S., & Cabido, M. 2001. Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in ecology & evolution*, 1611, 646-655.

Dickert TG, and Domeny KR. 1974 Environmental impact assessment: guidelines and commentary. University of California, Berkely.

Dieterich S, Bielick U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. 2000. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increase expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 101:33-9.

Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker 2015. Fitting Linear Mixed Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 671, 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

Drummond, GM 1998 *Hydromedusa maximiliani*. Pages 456-457 In: Machado ABM, Fonseca GAB, Machado RB, Aguiar LMS & Lins LV eds. Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Biodiversitas, Belo Horizonte.

Du C, Wu J, Bashir MH, Shaukat M, Ali S. 2019. Heavy metals transported through a multi-trophic food chain influence the energy metabolism and immune responses of *Cryptolaemus montrouzieri*. *Ecotoxicology* 28:422-428

Duan, Q.; Goodale, E. & Quan, R.-c. 2014. Bird fruit preferences match the frequency of fruit colours in tropical Asia. *Scientific Reports*, 4:5627.

Duarte, G. Santos, P.M., Cornelissen, T.G. Ribeiro, M. C. & Paglia, A.P. 2018. The effects of landscape patterns on ecosystem services: meta-analyses of landscape services. *Landscape Ecol*, 33: 1247. <https://doi.org/10.1007/s10980-018-0673-5>.

Dunning, J.B., Jr. 2008. CRC Handbook of avian body masses, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

Ebel A, and Davitashvili T. 2005 *Air, Water and Soil Quality Modelling for Risk and Impact Assessment*. Springer, Dordrecht.

eBird. 2020. eBird - Discover a new world of birding. Disponível em: <<https://ebird.org/home>>. Acesso em: 4 de agosto de 2020.

Eck, S.; Fiebig, J.; Fiedler, W.; Heynen, I.; Nicolai, B.; Töpfer, T.; Van den Elzen, R.; Winkler, R. & Woog, F. 2011. *Measuring birds*. Deutsche Ornithologischen-Gesellschaft, Wilhelmshaven.

Eisenberg, J. e Redford, K. 1999. *Mammals of the Neotropics*, Volume 3.

Elizalde L, Arbetman M, Arnan X, Eggleton P, Leal IR, Lescano MN, Saez A, Werenkraut V, Pirk GI 2020 The ecosystem services provided by social insects: traits, management tools and knowledge gaps. *Biological Reviews* in press.

Ello Ambiental Consultoria Ltda. 2020. Serviço de Avaliação de Impactos e Monitoramento da Flora Terrestre nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Colatina, ES.*sob análise.

Emer, C.; Galetti, M.; Pizo, M.A.; Guimarães Jr., P.R.; Moraes, S.; Piratelli, A. & Jordano, P. 2018. Seed-dispersal interactions in fragmented landscapes - a metanetwork approach. *Ecology Letters*, 21: 484-493.

EPA – US Environmental Protection Agency. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories (v1). Washington: EPA, 2000.

Estavillo, Candelaria; Pardini, Renata; Da Rocha, Pedro Luís Bernardo. Forest loss and the biodiversity threshold: An evaluation considering species habitat requirements and the use of matrix habitats. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2013.

Evans K, Guariguata MR, Brancalion PHS 2018 Participatory monitoring to connect local and global priorities for forest restoration. *Conservation Biology* 32:525-534.

Fadini, R.F. & De Marco Jr., P. 2004. Interações entre aves frugívoras e plantas em um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais. *Ararajuba*, 12: 97-103.

Fagan ME, Reid JL, Holland MB, Drew JG, Zahawi RA 2020 How feasible are global forest restoration commitments? *Conservation Letters* n/a:e12700.

Fahrig, Lenore. Rethinking patch size and isolation effects: the habitat amount hypothesis. *Journal of Biogeography*, v. 40, n. 9, p. 1649–1663, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jbi.12130>

Faria, D.; Laps, R.R.; Baumgarten, J. & Cetra, M. 2006. Bat and bird assemblages from forests and shade cacao plantations in two contrasting landscapes in the Atlantic Forest of southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 15: 587-612.

Farwig, N. & Berens, D.G. 2012. Imagine a world without seed dispersers: A review of threats, consequences and future directions. *Basic and Applied Ecology*, 13 2:109-115.

FBDS. Avaliação crítica da metodologia de avaliação de dados do monitoramento da biodiversidade e proposta de tratamento estatístico dos dados. Belo Horizonte: Fundação Renova e Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável FBDS; 2020.

Feinsinger, P. & Colwell, R.K. 1978. Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. *American Zoologist*, 18:779-795.

Fernando DR, Lynch JP 2015 Manganese phytotoxicity: New light on an old problem. *Ann. Bot.* 116: 313–319.

Florian Hartig 2020. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical Multi-Level / Mixed Regression Models. R package version 0.3.3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>

Folgarait, P.J. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiversity and Conservation* 7, 1221–1244 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1008891901953>.

Fonseca A 2015 A avaliação de impacto e o seu vínculo com o licenciamento ambiental. Pages 27-39 In: Org. JCJR, ed *Licenciamento ambiental: herói, vilão ou vítima?* Arraes Editores, Belo Horizonte.

Foster, M.S. 1987. Feeding methods and efficiencies of selected frugivorous birds. *The Condor*, 89:566-580.

Freitas AVL, Francini RB, Brown KS 2003 Insetos Como Indicadores Ambientais. Pages 123-155 In: Cullen L,

Valladares-Pádua C, Rudran R eds Métodos De Estudos Em Biologia Da Conservação e Manejo Da Vida Silvestre. Editora UFPR, Curitiba, PR.

Freitas AVL, Iserhard CA, Santos JP, Carreira JYO, Ribeiro DB, Melo DHA, Rosa AHB, Marini-Filho OJ, Accacio GM, Uehara-Prado M 2014 Studies with butterfly bait traps: an overview. *Revista Colombiana de Entomología* 40:209-218.

Freitas AVL, Iserhard CA, Santos JP, Carreira JYO, Ribeiro DB, Melo DHA, Rosa AHB, Marini-Filho OJ, Accacio GM, Uehara-Prado M 2014. Studies with butterfly bait traps: An overview. *Revista Colombiana De Entomología*, 40: 203–212

Freitas AVL, Leal IR, Uehara-Prado M, Iannuzzi L 2006. Insetos como bioindicadores de conservação da paisagem. Pages 357-384 In: Rocha CFD, Gergallo HG, Alves MAS, Sluys MV eds *Biologia da conservação: essências*. Rima Editora, São Carlos, SP.

Fukami, T. Historical Contingency in Community Assembly: Integrating Niches, Species Pools, and Priority Effects. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 46:1–23, 2015.

Gadagkar R, Padmini N, Chandrashekara K, Bhat DM 2000 Ants species diversity in the Western Ghats, India. In: Agosti D, Majer JD, Alonso LE and Schultz TR Eds. *Sampling ground-dwelling ants: case studies from the world's Rain Forests*. Curtin University of Technology, School of Environmental Biology, Bulletin No. 18.

Gagnon V, Rodrigue-Morin M, Migneault M, Tardif A, Garneau L, Lalonde S, Roy S 2020 Survival, growth and element translocation by 4 plant species growing on acidogenic gold mine tailings in Québec. *Ecological Engineering* 151: 105855.

Galetti, M.; Guevara, R.; Côrtes, M.C.; Fadini, R.; Von Matter, S.; Leite, A.B.; Labecca, F.; Ribeiro, T.; Carvalho, C.S.; Collevatti, R.G.; Pires, M.M.; Guimarães Jr., P.R.; Brancalion, P.H.; Ribeiro, M.C. & Jordano, P. 2013. Functional extinction of birds drives rapid evolutionary changes in seed size. *Science*, 340: 1086-1090.

Galhardi JA, de Mello JW, Wilkinson KJ 2020 Bioaccumulation of potentially toxic elements from the soils surrounding a legacy uranium mine in Brazil. *Chemosphere*: 127679.

Garfi M, Ferrer-Martí L, Bonoli A, and Tondelli S 2011 Multi-criteria analysis for improving strategic environmental assessment of water programmes. A case study in semi-arid region of Brazil. *Journal of Environmental Management* 92:665-675.

Garrison RW, Von Ellenrieder N, Louton JA 2006 *Dragonfly genera of the new world: an illustrated and annotated key to the Anisoptera*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 368p.

Garrison RW, Von Ellenrieder N, Louton JA 2010 *Damselfly genera of the New World: an illustrated and annotated key to the Zygoptera*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 490p.

Gerritsen J, Patten BC 1985 System theory formulation of ecological disturbance. *Ecol. Modelling* 29:383-397.

Gibbons, D.W.; Hill, D.A. & Sutherland, W.J. 1996. Birds, p. 227-259. In: Sutherland, W.J. ed. *Ecological census techniques, a handbook*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Grantsau, R. 1988. Os beija-flores do Brasil. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, Brazil.
- Gregory, R.D.; Gibbons, D.W. & Donald, P.F. 2004. Bird census and survey techniques In: Sutherland, W.J.; Newton, I. & Green, R.E. Eds., Bird ecology and conservation: a handbook of techniques. Oxford University Press, Oxford, p.17-55.
- Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M 2009 Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quimica Nova 32: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
- Guerra MBB, Teaney BT, Mount BJ, Asunskis DJ, Jordan BT, Barker RJ, Santos EE, Schaefer CEGR 2017 Post-catastrophe analysis of the fundão tailings dam failure in the Doce river system, Southeast Brazil: Potentially toxic elements in affected soils. Water. Air. Soil Pollut.: 228.
- Guerra, A.; Reis, L.K.; Borges, F.L.G.; 2020 Ecological restoration in Brazilian biomes: Identifying advances and gaps. Forest Ecology and Management 458:117802.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249:7130-7139.
- Hadley, A.S.; Frey, S.J.K.; Robinson, W.D. & Betts, M.G. 2018. Forest fragmentation and loss reduce richness, availability, and specialization in tropical hummingbird communities. Biotropica, 50:74-83.
- Hakanson L 1980 An ecological risk index for aquatic pollution control: A sedimentological approach. Water Res 14:975–1001
- Halffter G, Edmonds WD 1982 The nesting behaviour of dung beetles Escarabeínae. Instituto de Ecología, México DF.
- Hanski I 1991 Dung Beetle Ecology. Princeton University Press, New Jersey.
- Harabiš F, Dolný A 2015 Necessity for the conservation of drainage systems as last refugia for threatened damselfly species, *Coenagrion ornatum*. Insect Conservation and Diversity 8:143-151.
- Heckman C 2006 Encyclopedia of South American aquatic insects: Odonata – Zygoptera. Springer Science, Olympia, WA, 692p.
- Hembry DH, Weber MG 2020 Ecological Interactions and Macroevolution: A New Field with Old Roots. Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics 51:215-43.
- Henriques NR, Cornelissen T 2019 Wing asymmetry of a butterfly community: is altitude a source of stress? Community Ecology 20:252-257.
- Hill, M. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. Ecology 54:427–432.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK 1999 Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds.

Planta 207: 604–611

Holl KD 2017 Restoring tropical forests from the bottom up. *Science* 355:455-456.

Hölldobler B, Wilson EO 2009 *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. W. W. Norton & Company, New York, NY, United States of America.

Hopkins LD 1977 Methods for Generating Land Suitability Maps: A Comparative Evaluation. *Journal of the American Institute of Planners* 43:386-400.

Howe, H.F. & Smallwood, J. 1982. Ecology of Seed Dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 201–228.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2018. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: Volume III – Aves. Brasília: ICMBio/MMA, 709 p.

Instituto Ekos Brasil. 2020. Relatório de Definição dos Indicadores de Biodiversidade PG 30 e PG 28. Instituto Ekos Brasil. São Paulo, Brasil.

IUCN. 2018 Os Impactos do rompimento da Barragem de Fundão: o caminho para uma mitigação sustentável e resiliente. IUCN, Gland, Suíça.

IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species version 2018.1. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/search.php>>. Acesso em 11 jul 2020.

IUCN. 2020. The IUCN red list of threatened species. Version 2020-1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 21 de junho de 2020.

Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner 2019. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Johansson F, Orizaola G and Nilsson-Örtman V 2020 Temperate insects with narrow seasonal activity periods can be as vulnerable to climate change as tropical insect species. *Scientific Reports* 10: 8822.

Jost, L. 2007, PARTITIONING DIVERSITY INTO INDEPENDENT ALPHA AND BETA COMPONENTS. *Ecology*, 88: 2427-2439. <https://doi.org/10.1890/06-1736.1>

Julien B, Fenves SJ, and Small MJ 1992 An environmental impact identification system. *Journal of Environmental Management* 36:167-184.

Justino, D.G.; Maruyama, P.K. & Oliveira, P.E. 2012. Floral resource availability and hummingbird territorial behaviour on a Neotropical savanna. *Journal of Ornithology*, 153:189-197.

Kaur I, Khandwekar S, Chauhan R, Singh V, Jadhav SK, Tiwari KL, Quraishi A 2019 Exploring the efficiency of native tree species grown at mine tailings for phytoextraction of lead and iron. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 89: 951-956.

Kaya T, and Kahraman C 2011 An integrated fuzzy AHP–ELECTRE methodology for environmental impact assessment. *Expert Systems with Applications* 38:8553-8562.

Kellner JR, Alford RA 2003 The ontogeny of fluctuating asymmetry. *American Naturalist* 161: 931–947.

Kelly C. 2013 Strategic Environmental Impact Assessments and Disasters: Building Back Smarter. ABUHC Disaster Management Working Paper 29.

Kelly C. 2005 Guidelines for Rapid Environmental Impact in Disasters REA. Version 4.4 April 2005. Benfield Hazard Research, Centre University College London and CARE International.

Kennedy PG, Bergemann SE, Hortal S, Bruns TD 2007 Determining the outcome of field-based competition between two *Rhizopogon* species using real-time PCR. *Molecular Ecology* 16:881-890.

Kevan P.G. 2008 Pollination and Flower Visitation. In: Capinera J.L. eds *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_3027

Khan A, Khan S, Khan MA, Qamar Z, Waqas M 2015 The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 13772 - 13799.

Kietzka GJ, Pryke JS, Samways MJ 2017 Aerial adult dragonflies are highly sensitive to in-water conditions across an ancient landscape. *Diversity and Distribution* 23: 14-26.

King, C.; Ballantyne, G. & Willmer, P.G. 2013. Why flower visitation is a poor proxy for pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, 4:811-818.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T 2007 Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of The Royal Society B* 274:303-313.

Kozlov MV, Cornelissen T, Gavrikov DE, Kunavin MA, Lama AD, Milligan JR, Zverev V, Zvereva EL 2017 Reproducibility of fluctuating asymmetry measurements in plants: Sources of variation and implications for study design. *Ecological Indicators* 73:733–740.

Kozlov MV, Zvereva EL 2017 Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology. Pages 313-355 In: Cánovas F, Lüttge U, Matyssek R eds *Progress in Botany*, vol 79. Springer.

Kremen C., et al. 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecol. Lett.* 10, 299–314. Doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01018.x.

Krohn RM, Palace V, Smits JEG 2020. Metal changes in pre and post metamorphic wood frog *Lithobates sylvaticus* tadpoles: implications for ecotoxicological studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00735-w>

Lactec. Diagnóstico socioambiental dos danos decorrentes do rompimento da barragem de Fundão na bacia do rio Doce e região costeira adjacente TOMO I – Contextualização Diagnóstico de Danos. Curitiba: Instituto Lactec; 2020.

Lanna, L.L.; Azevedo, C.S.; Claudino, R.M.; Oliveira, R. & Antonini, Y. 2017. Feeding behavior by hummingbirds Aves: Trochilidae in artificial food patches in an Atlantic Forest remnant in southeastern Brazil. *Zoologia*, 34:e13228.

Laps, R.R.; Cordeiro, P.H.C.; Kajiwara, D.; Ribon, R.; Rodrigues, A.A.F. & Uejima, A. 2003. Aves. In: Rambaldi, D.M. & Oliveira, D.A.S. eds. *Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 153-181.

Las-Casas, F.M.G.; Azevedo Júnior, S.M. & Dias Filho, M.M. 2012. The community of hummingbirds Aves: Trochilidae and the assemblage of flowers in a Caatinga vegetation. *Brazilian Journal of Biology*, 72:51-58.

Latawiec, AE, Crouzeilles, R, Brancalion, PHS, Rodrigues, RR, Sansevero, JB, Santos, JS, Mills, M, Nave, AG, Strassburg, BB. 2016. Natural regeneration and biodiversity: a global meta-analysis and implications for spatial planning. *BIOTROPICA* 486: 844–855.

Laurance, W. F. et al. 2007. Habitat Fragmentation, Variable Edge Effects, and the Landscape-Divergence Hypothesis. *PLoS ONE*, v. 2, n. 10, p. e1017.

Lavorel, S., & Grigulis, K. 2012. How fundamental plant functional trait relationships scale-up to trade-offs and synergies in ecosystem services. *Journal of Ecology*, 1001, 128-140.

Lawrence DP 2007 Impact significance determination - pushing the boundaries. *Environmental Impact Assessment Review* 27:770-788.

Lee KP, Raubenheimer D, Simpson SJ 2004. The effects of nutritional imbalance on compensatory feeding for cellulose-mediated dietary dilution in a generalist caterpillar. *Physiological Entomology* 29: 108-117.

Lehmann, L.J.; Maruyama, P.K.; Bergamo, P.J.; Maglianesi, M.A.; Rahbek, C. & Dalgaard, B. 2019. Relative effectiveness of insects versus hummingbirds as pollinators of Rubiaceae plants across elevation in Dominica, Caribbean. *Plant Biology*, 21:738–744.

Lencioni FAA 2005 The damselflies of Brazil: an illustrated guide – The non Coenagrionidae families. All Print Editora. 332p.

Lencioni FAA 2017 Damselflies of Brazil: An Illustrated Identification Guide: Southeast Region, first ed. Self-published.

Lens L, Van Dongen S, Kark S, Matthysen E 2002 Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biology Reviews* 77: 27–38.

Leopold LB, Clarke FE, Hanshaw BB, and Balsley JR. 1971 A Procedure for Evaluating Environmental Impact Geological Survey Circular 645. United States Geological Survey USGS, Washington.

Lessa, L. G. & Costa, F. N. 2010. Diet and seed dispersal by five marsupials Didelphimophia: Didelphidae in Brazilian Cerrado Reserve. *Mamm Biol* 75:10-16.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357.

Lima, C.A.; Siqueira, P.R.; Gonçalves, R.M.M.; Vasconcelos, M.F. & Leite, L.O. 2010. Dieta de aves da Mata Atlântica: uma abordagem baseada em conteúdos estomacais. *Ornitologia Neotropical*, 21:425-438.

Liu YJ, Zhu YG, Ding H 2007 Lead and cadmium in leaves of deciduous trees in Beijing, China: Development of a metal accumulation index MAI. *Environ Pollut* 145:387–390

Liu Z, Hamuti A, Abdulla H, Zhang F, Mao X 2016 Accumulation of metallic elements by native species thriving in two mine tailings in Aletai, China. *Environmental Earth Sciences* 75: 781.

Londe V, Farah FT, Rodrigues RR, Martins FR 2020 Reference and comparison values for ecological indicators in assessing restoration areas in the Atlantic Forest. *Ecological Indicators* in press.

Londe, V., F. Turini Farah, R. Ribeiro Rodrigues, and F. Roberto Martins. 2020. Reference and comparison values for ecological indicators in assessing restoration areas in the Atlantic Forest. *Ecological Indicators* 110:105928.

Lopes, L.E.; Fernandes, A.M. & Marini, M.Â. 2005. Diet of some Atlantic Forest birds. *Ararajuba*, 13:95-103.

López P, Muñoz A, Martín J 2002 Symmetry, male dominance and female mate preferences in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 52: 342–347.

Loreau M, Mouquet N 2003 Biodiversity as spatial insurance in heterogeneous landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:12765-12770.

Loures-Ribeiro, A.; Manhães, M.A. & Dias, M.M. 2011. Sensitivity of understory bird species in two different successional stages of the lowland Atlantic Forest, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83: 973-980.

Low PA, Sam K, McArthur C, Posa MRC, Hochuli DF 2014 Determining predator identity from attack marks left in model caterpillars: guidelines for best practice. *Entomolgia Experimentalis et Applicata* 152:120-126.

Lozano-Baez, SE, Cooper, M, Ferraz, SFB, Rodrigues, RR, Lassabatere, L, Castellini, M, Di Prima, S. 2020. Assessing Water Infiltration and Soil Water Repellency in Brazilian Atlantic Forest Soils. *Appl. Sci.* 10, 1950; doi:10.3390/app10061950.

Machado, A.B.M.; Drummond, G.M. & Paglia, A.P. 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Volume II. Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 907 p.

Machado, A.B.M.; Fonseca, G.A.B.; Machado, R.B.; Aguiar, L.M.S. & Lins, L.V. 1998. Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 605 p.

Machado, B. B., J. P. M. Orue, M. S. Arruda, C. V. Santos, D. S. Sarath, W. N. Goncalves, G. G. Silva, H. Pistori, A. R. Roel, and J. F. Rodrigues-Jr. 2016 BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. *Computers and Electronics in Agriculture* 129:44–55.

Magioli, M. et al. Thresholds in the relationship between functional diversity and patch size for mammals in the Brazilian Atlantic Forest. *Animal Conservation*, v. 18, n. 6, p. 499–511, 2015.

Maglianesi, M.A.; Blüthgen, N.; Böhning-Gaese, K. & Schleuning, M. 2014. Morphological traits determine specialization and resource use in plant–hummingbird networks in the neotropics. *Ecology*, 95:3325–3334.

Maldonado-Coelho, M. & Marini, M.Â. 2000. Effects of forest fragment size and successional stage on mixed-species bird flocks in southeastern Brazil. *The Condor*, 102: 585-594.

Maldonado-Coelho, M. & Marini, M.Â. 2003. Composição de bandos mistos de aves em fragmentos de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo*, 43: 31-54.

Maldonado-Coelho, M. & Marini, M.Â. 2004. Mixed-species bird flocks from Brazilian Atlantic forest: the effects of forest fragmentation and seasonality on their size, richness and stability. *Biological Conservation*, 116: 19-26.

Manhães, M.A.; Assis, L.C.S. & Castro, R.M. 2003. Frugivoria e dispersão de sementes de *Miconia urophylla* Melastomataceae por aves em um fragmento de Mata Atlântica secundária em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Ararajuba*, 11: 173-180.

Manhães, M.A.; Loures-Ribeiro, A. & Dias, M.M. 2010. Diet of understory birds in two Atlantic Forest areas of southeast Brazil. *Journal of Natural History*, 44:469-489.

MapBiomias. Coleção MapBiomias. 2020.

Marini, M.Â. 2000. Efeitos da fragmentação florestal sobre as aves em Minas Gerais. In: Alves, M.A.S.; Silva, J.M.C.; van Sluys, M.; Bergallo, H.G. & Rocha, C.F.D. eds. *A Ornitologia no Brasil: pesquisa atual e perspectivas*. Rio de Janeiro: Editora Universidade do Estado do Rio de Janeiro, p. 41-54.

Marques TG, Espírito-Santo MM, Neves FS, Schoereder JH 2017 Ant Assemblage Structure in a Secondary Tropical Dry Forest: The Role of Ecological Succession and Seasonality. *Sociobiology*, 64:261.

Marsden, S.J.; Whiffin, M. & Galetti, M. 2001. Bird diversity and abundance in forest fragments and Eucalyptus plantations around an Atlantic Forest reserve, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 10: 737-751.

Martensen, A.C.; Pimentel, R.G. & Metzger, J.P. 2008. Relative effects of fragment size and connectivity on bird community in the Atlantic Rain Forest: implications for conservation. *Biological Conservation*, 141: 2184-2192.

Martensen, A.C.; Ribeiro, M.C.; Banks-Leite, C.; Prado, P.I. & Metzger, J.P. 2012. Associations of forest cover, fragment area, and connectivity with neotropical understory bird species richness and abundance. *Conservation Biology*, 26: 1100-1111.

Martins S.V. 2014. *Recuperação de Matas Ciliares*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 220p.

Matos LP, Andrade HM, Marinato CS, Prado IG, Coelho DG, Montoya SG, Kasuya MC, Oliveira JA 2020 Limitations to use of *Cassia grandis* L. in the revegetation of the areas impacted with mining tailings from Fundão dam. *Water Air Soil Pollut.* 231:127-136.

Matos, V.P.V.; Matos, T.P.V.; Cetra, M.; Timo, T.P.C. & Valente, R.A. 2018. Forest fragmentation and impacts on the bird community. *Revista Árvore*, 42: e420309.

Mayfield, M. M., M. F. Boni, and D. D. Ackerly. 2009. Traits, habitats, and clades: identifying traits of potential importance to environmental filtering. *American Naturalist* 174:E1–E22.

McDowell, NG, Allen, CD, Anderson-Teixeira, K, Aukema, BH, Bond-Lamberty B, Chini, L, Clark, JS, Dietze, M, Grossiord, C, Hanbury-Brown, A, Hurtt, GC, Jackson, RB, Johnson, DJ, Kueppers, L, Lichstein, JW, Ogle, K, Poulter, B, Pugh, TAM, Seidl, R, Turner, MG, Uriarte, M, Walker, AP, Xu, C. 2020. Pervasive shifts in forest dynamics in a changing world. *Science* 368, 964 2020.

Melo FPL, Pinto SRR, Brancalion PHS, Castro PS, Rodrigues RR, Aronson J, Tabarelli M 2013 Priority setting for scaling-up tropical forest restoration projects: Early lessons from the Atlantic Forest Restoration Pact. *Environmental Science & Policy* 33:395-404.

Mendes GM et al 2020 How much leaf area do insects eat? A dataset of insect herbivory sampled globally with a standardized protocol. *Ecology in review*.

Metzger, J. P., Martensen, A. C., Dixo, M., Bernacci, L. C., Ribeiro, M. C., Teixeira, A. M. G., & Pardini, R. 2009. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. *Biological conservation*, 1426, 1166-1177

Midhat L, Ouazzani N, Esshaimi M, Ouhammou A, Mandi L 2017 Assessment of heavy metals accumulation by spontaneous vegetation: Screening for new accumulator plant species grown in Kettara mine-Marrakech, Southern Morocco. *International Journal of Phytoremediation* 19: 191-198.

Millennium Ecosystem Assessment. 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. 2020. Brasil reflorestará 12 milhões de floresta até 2030. 2015. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/informma/item/12824-noticia-acom-2015-06-987.html>. Acesso em: 27 jan.

MMA. 2014. Portaria No. 444, de 17 de dezembro de 2014 - Lista nacional oficial de espécies da fauna ameaçadas de extinção. *Diário Oficial da União - Seção 1*, 18 Dezembro 2014:121-126.

Modena, E.S.; Rodrigues, M. & Souza, A.L.T. 2013. Trophic structure and composition of an understory bird community in a succession gradient of Brazilian Atlantic forest. *Ornithologia*, 6: 78-88.

Møller AP 1997 Developmental stability and fitness: A review. *American Naturalist* 149: 916–932.

Montoya- Pfeiffer, PM, Rodrigues, RR, Alves Dos Santos, I, 2020. Bee pollinator functional responses and functional effects in restored tropical forests. *ECOLOGICAL APPLICATIONS*, v.30, 3 p.02054. doi.org/10.1002/eap.2054.

Moojen, J.; Carvalho, J.C. & Lopes, H.S. 1941. Observações sobre o conteúdo gástrico das aves brasileiras. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 36:405-444.

Moreau CS, Bell CD 2013. Testing the museum versus cradle tropical biological diversity hypothesis: Phylogeny, diversification, and ancestral biogeographic range evolution of the ants. *Evolution* 67:2240-2257.

Moreira-Lima, L. 2013. Aves da Mata Atlântica: riqueza, composição, status, endemismos e conservação tese de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Morgan RK. 1998 *Environmental Impact Assessment: A Methodological Approach*. Springer, Norwell

Mossop KF, Davidson CM 2003 Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Anal. Chim. Acta* 478: 111-118, 10.1016/S0003-26700201485-X

Munier N. 2004 *Multicriteria Environmental Assessment: A Practical Guide*. Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.

Muylaert, R.L.; Steven, R.D.; Ribeiro, M.C. Threshold effect of habitat loss on bat richness in cerrado-forest landscape. *Ecological Applications*, v. 26, n. 6, p. 1854–1867, 2016.

Nações Unidas Brasil. 2019. ONU declara Década sobre Restauração de Ecossistemas. 2019. Available in: <<https://nacoesunidas.org/onu-declara-decada-sobre-restauracao-de-ecossistemas/>>. Assessed on 27 september.

Naeem S, Thompson LJ, Lawler SP, Lawton JH, Woodfin RM 1994 Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature* 368:734-737.

Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM 2010 Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chemistry Letters* 8:199-216

Nanni AS, Sloan S, Aide TM, Graesser J, Edwards D, Grau HR 2019 The neotropical reforestation hotspots: A biophysical and socioeconomic typology of contemporary forest expansion. *Global Environmental Change* 54:148-159.

Navarro-Cano JA, Verdú M, Goberna M 2018 Trait-based selection of nurse plants to restore ecosystem functions in mine tailings. *Journal of Applied Ecology* 55: 1195-1206.

Nawab J, Khan S, Shah MT, Khan K, Huang Q, Ali R 2015 Quantification of heavy metals in mining affected soil and their bioaccumulation in native plant species. *International Journal of Phytoremediation* 17: 801-813.

Nemésio A, Santos Júnior J 2014 Is the “Centro de Endemismo Pernambuco” a biodiversity hotspot for orchid bees? *Brazilian Journal of Biology* 74:78-92.

Nessimian JL, Venticinque EM, Zuanon J, De Marco Jr P, Gordo M, Fidelis L, Batista JD, Juen L 2008 Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. *Hydrobiologia* 614:117.

Neves FS, Oliveira VHF, Espírito-Santo MM, Vaz-de-Mello FZ, Louzada J, Sanchez-Azofeifa A, Fernandes GW 2010. Seasonal and successional changes in a community of dung beetles Coleoptera: Scarabaeinae in a Brazilian tropical dry forest. *Brazilian Journal for Nature Conservation* 8:160-164.

Neves, F. S., J. O. Silva, M. M. Espírito-Santo and G. W. Fernandes. 2014. Insect Herbivores and Leaf Damage along Successional and Vertical Gradients in a Tropical Dry Forest. *Biotropica* 46:14-24.

Nichols E, Larsen T, Spector S, Davis AL, Escobar F, Favila M, Vuline K, N. Scarabaeinae Res 2007 Global Dung Beetle Response to Tropical Forest Modification and Fragmentation: A Quantitative Literature Review and Meta-Analysis. *Biological Conservation* 137:1-19.

Nichols E, Spector S, Louzada J, Larsen T, Amequita S, Favila ME, N. Scarabaeinae Res 2008 Ecological Functions and Ecosystem Services Provided by Scarabaeinae Dung Beetles. *Biological Conservation* 141:1461-1474.

Nikolic M, Pavlovic J 2018 Plant responses to iron deficiency and toxicity and iron use efficiency in plants. In: *Plant micronutrient use efficiency: Molecular and genomic perspectives in crop plants*. Elsevier Inc., pp. 55–69.

Norden, Natalia & Angarita, Hector & Bongers, Frans & De la Cerda, Inigo & van Breugel, Michiel & Lebrija-Trejos, Edwin & Meave, Jorge & Vandermeer, John & Williamson, G. & Finegan, Bryan & Mesquita, Rita & Chazdon, Robin. (2015). Successional dynamics in Neotropical forests are as uncertain as they are predictable. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112. 10.1073/pnas.1500403112.

Novais SMA, Nunes CA, Santos NB, D'Amico AR, Fernandes GW, Quesada M, Braga RF, Neves ACO 2016 Effects of a possible pollinator crisis on food crop production in Brazil. *PLoS ONE* 11:e0167292.

Numelin ML, Lodenius M, Tulisalo E, Hirvonen H, Alanko T. 2007. Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 145:339-347.

Nunes CA, Braga RF, Resende FM, Neves FS, Figueira JEC, Fernandes GW 2018 Linking biodiversity, the environment and ecosystem functioning: ecological functions of dung beetles along a tropical elevational gradient. *Ecosystems* 21:1244-1254.

Nunes Cássio Alencar, Castro Flávio S., Brant Humberto S. C., Powell Scott, Solar Ricardo, Fernandes G. Wilson, Neves Frederico S. High Temporal Beta Diversity in an Ant Metacommunity, With Increasing Temporal Functional Replacement Along the Elevational Gradient *Frontiers in Ecology and Evolution* 8 2020: 392 DOI=10.3389/fevo.2020.571439

Oksanen J, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlenn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2019). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Oliveira FA, Abreu AT, Nascimento NO, Froes RES, Nalini Jr HA, Antonini Y. 2020. Mineral content in honey and pollen from native stingless bees *Tetragonisca angustula* in the iron quadrangle, Brazil. *Journal of Apicultural Research* 59: 378-389.

Olmos, F. & Boulhosa, R.L.P. 2000. A meeting of opportunists: birds and other visitors to *Mabea fistulifera* Euphorbiaceae inflorescences. *Ararajuba*, 8: 93-98.

Oostermeijer JGB, van Swaay CAM 1998 The Relationship between Butterflies and Environmental Indicator Values: A Tool for Conservation in a Changing Landscape. *Biological Conservation* 86:271-280.

Pacto pela Restauração da Mata Atlântica. 2009. Método utilizado para o mapeamento das áreas potenciais de restauração na Mata Atlântica. Disponível em <http://www.pactomataatlantica.org.br>.

Paglia, A.P., Fonseca, G.A.B. da, Rylands, A. B., Herrmann, G., Aguiar, L. M. S., Chiarello, A. G., Leite, Y. L. R., Costa, L. P., Siciliano, S., Kierulff, M. C. M., Mendes, S. L., Tavares, V. da C., Mittermeier, R. A. & Patton J. L. 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição / 2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp

Palmer A.R., Strobeck C. Fluctuating asymmetry analyses revisited. 2003. Pp. 279–319 in Polak, M. Ed. *Developmental Instability DI: Causes and consequences*. Oxford: Oxford University Press.

Palmer AR 1994 Fluctuating asymmetry analyses: a primer. Pages 335–345 In: Markow TA ed. *Developmental Instability: Its origins and evolutionary implications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Palmer AR, Strobeck C 1986 Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 391–421.

Parker, T.A., III. 1991. On the use of tape recorders in avifaunal surveys. *The Auk*, 108: 443-444.

Parker, T.A., III; Stotz, D.F. & Fitzpatrick, J.W. 1996. Ecological and distributional databases. In: Stotz, D.F.; Fitzpatrick, J.W.; Parker, T.A., III & Moskovits, D.K. Eds., *Neotropical birds: ecology and conservation*. University of Chicago Press, Chicago, p.113-436.

Parmar TK, Rawtani D, Agrawal YK 2016 Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science* 9:110-118.

Patrick English 2019. *its.analysis: Running Interrupted Time Series Analysis*. R package version 1.4.1. <https://CRAN.R-project.org/package=its.analysis>

Peixoto P.E., Benson W.W. 2011 Fat and body mass predict residency status in tow tropical satyrinae butterflies. *Ethology* 117: 722.730.

Pérez, DR, Pilustrelli, C, Farinaccio, FM, Sabino, G, Aronson, J. 2020. Evaluating success of various restorative interventions through drone and field-collected data, using six putative framework species in Argentinian Patagonia. *Restoration Ecology* Vol. 28, No. A1, pp. A44–A53. [Doi.org/10.1111/rec.13025](https://doi.org/10.1111/rec.13025).

Pérez-Iglesias JM, de Arcaute CR, Natale GS, Soloneski S, Larramendy ML 2017. Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III-and Fpgmodified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles Anura, Hylidae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 503–508.

Piacentini, V.Q.; Aleixo, A.; Agne, C.E.; Maurício, G.N.; Pacheco, J.F.; Bravo, G.A.; Brito, G.R.R.; Naka, L.N.;

Olmos, F.; Posso, S.R.; Silveira, L.F.; Betini, G.S.; Carrano, E.; Franz, I.; Lees, A.C.; Lima, L.M.; Pioli, D.; Schunck, F.; Amaral, F.R.; Bencke, G.A.; Cohn-Haft, M.; Figueiredo, L.F.A.; Straube, F.C. & Cesari, E. 2015. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 23:91-298.

Pignataro T & Cornelissen T 2020 Urbanization alters wing fluctuating asymmetry of Neotropical butterflies. *Landscape Ecology* in press.

Pimm SL, Jenkins CN, Abell R, Brooks TM, Gittleman JL, Joppa LN, Raven PH, Roberts CM, Sexton JO 2014 The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science* 344: 1246752.

Pinek L, Mansour I, Lakovic M, Ryo M, Rillig MC 2020 Rate of environmental change across scales in ecology. *Biological Reviews* in pres.

Piratelli, A.; Sousa, S.D.; Corrêa, J.S.; Andrade, V.A.; Ribeiro, R.Y.; Avelar, L.H. & Oliveira, E.F. 2008. Searching for bioindicators of forest fragmentation: passerine birds in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68: 259-268.

Pires, APF, Rezende, CL, Assad, ED, Loyola, R, Scarano, FR. 2017. Forest restoration can increase the Rio Doce watershed resilience. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 15: 187–193.

Pires, L.P.; Gonçalves, V.F.; Ferreira, G.Â.; Camelo, F.R.B. & Melo, C. 2018. Fruit colour and edge effects poorly explains frugivorous bird-plant interactions in disturbed semideciduous forests. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 40:e40041.

Pizo, M.A. 2001. A conservação das aves frugívoras. In: Albuquerque, J.L.B.; Cândido Jr, J.F.; Straube, F.C. & Roos, A.L. eds. *Ornitologia e conservação: da ciência às estratégias*. Tubarão: Editora Unisul, p. 49-59.

Popic TJ, Davila YC, Wardle GM 2013 Evaluation of Common Methods for Sampling Invertebrate Pollinator Assemblages: Net Sampling Out-Perform Pan Traps. *Plos One*, v.8.

Prather CM, Pelini SL, Laws A, Rivest E, Bloch CP, Del Toro I, Ho C, Newbold TAS, Parsons S, Joern A 2013 Invertebrates, ecosystem services and climate change. *Biological Reviews* 88:327-348.

Project MapBiomas - Collection 5.0 of Brazilian Land Cover & Use Map Series, accessed on nov/2020 through the link: <https://mapbiomas.org/>

Protomastro, A. 2001. A test for preadaptation to human disturbances in the bird community of the Atlantic Forest. In: Albuquerque, J.L.B.; Cândido Jr, J.F.; Straube, F.C. & Roos, A.L. eds. *Ornitologia e conservação: da ciência às estratégias*. Tubarão: Editora Unisul, p. 179-198.

Quadra, GR, Roland, F, Barros, N, Malm, O, Lino, AS, Azevedo, GM, Thomaz, JR, Andrade-Vieira, LF, Praça-Fontes, MM, Almeida, RM, Mendonça, RF, Cardoso, SJ, Guida, YS, Campos, JMS 2018 Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. *Chemosphere* 215: 753-757.

Queiroz HM, Nóbrega GN, Ferreira TO, Almeida LS, Romero TB, Santaella ST, Bernardino AF, Otero XL 2018 The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? *Sci Total Environ*

637:498–506

Quesada M, Sanchez-Azofeifa GA, Alvarez-Añorve M, Stoner KE, Avila-Cabadilla L, Calvo-Alvarado J, Castillo A, Espírito-Santo MM, Fagundes M, Fernandes GW, Gamon J, Lopezaraiza-Mikel M, Lawrence D, Morellato LPC, Powers JS, Neves FS, Rosas-Guerrero V, Sayago R, Sanchez-Montoya G 2009 Successional and management of tropical dry forests in the Americas: review and new perspectives. *Forest Ecology and Management* 258:1014-1024.

R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rabello AM, de Bernardi-Oliveira LF and Ribas CR 2014 Testing an artificial aril as a new ant-attractant. *Revista Biociências* 20: 86-90.

Rader R et al 2016 Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *PNAS* 113: 146-151.

Ramanathan R 2001 A note on the use of the analytic hierarchy process for environmental impact assessment. *Journal of Environmental Management* 63:27-35.

Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Barahona E, Lachica M, Ure M, Davidson CM, Gomez A, Lück D, Bacon J, Yli-Halla M, Muntau H, Quevauviller P 2000 Application of a modified BCR sequential extraction three-step procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material CRM 483, complemented by a three-year stability study of acetic acid. *J. Environ. Monit.* 2: 228-233, 10.1039/b001496f

Rauret G, López-Sánchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A, Quevauviller P 1999 Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J. Environ. Monit.* 1: 57-61, 10.1039/a807854h

Reeve MJ, Smith PD, Thomasson J 1973 The effect of density on water retention properties of field soils. *J Soil Sci* 24:355–367

Reis DA, Fonseca Santiago A, Nascimento LP, Roeser HMP 2017 Influence of environmental and anthropogenic factors at the bottom sediments in a Doce River tributary in Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24: 7456–7467.

Reis, BP, Martins, SV, Fernandes Filho, EI, Sarcinelli, TS, Gleriania, JM, Leite, HG, Halassyd, M. 2019. Forest restoration monitoring through digital processing of high resolution images. *Ecological Engineering* 127 2019 178–186.

Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A. & Lima, I. P. 2011. *Mamíferos do Brasil*. 2ed. Londrina, 437p.

Remsburg AJ, Turner MG 2009 Aquatic and terrestrial drivers of dragonfly Odonata assemblages within and among north-temperate lakes. *Journal of the North American Benthological Society* 28: 44–56 review. *Biodiversity and Conservation* 7:1221-1244.

Revilla TA, Encinas F 2015 Dynamical transitions in a pollination – Herbivory interaction: A conflict between mutualism and antagonism. *PLoS One* 10:1–18.

Rezende, C. L., Scarano, F. R., Assad, E. D., Joly, C. A., Metzger, J. P., Strassburg, B. B. N., Tabarelli, M., Fonseca, G. A., Mittermeier, R. A. 2018. From hotspot to hopespot : An opportunity for the Brazilian Atlantic. *Perspectives in Ecology and Conservation*. 164, 208–214.

Rezende, C. L., Scarano, F. R., Assad, E. D., Joly, C. A., Metzger, J. P., Strassburg, B. B. N., Tabarelli, M., Fonseca, G. A. & Mittermeier, R. A. 2018. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in ecology and conservation*, 164, 208-214.

Rhodin AGJ et al. 2017 *Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status*. Chelonian Research Foundation & Turtle Conservancy.

Ribas CR, Campos RBF, Schmidt FA, Solar RRC 2012 *Ants as Indicators in Brazil: A Review with Suggestions to Improve the Use of Ants in Environmental Monitoring Programs*. *Psyche* 1-23.

Ribas ER & Monteiro Filho ELA 2002 *Distribuição e habitat das tartarugas de água-doce Testudines, Chelidae do Estado do Paraná, Brasil*. *Biociências* 10: 15-32.

Ribeiro da Silva, F, Montoya, D, Furtado, R, Memmott, J, Pizo, MA, Rodrigues, RR. 2015. The restoration of tropical seed dispersal networks. *Restoration Ecology*. v.23, 6: 852-860. [Doi.org/10.1111/rec.12244](https://doi.org/10.1111/rec.12244).

Ribeiro EMS, Arroyo-Rodriguez V, Santos BA, Tabarelli M, Leal IR 2015 *Chronic anthropogenic disturbance drives the biological impoverishment of the Brazilian Caatinga vegetation*. *Journal of Applied Ecology* 52:611–620.

Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 1426, 1141-1153.

Ribon, R.; Simon, J.E. & Mattos, G.T. 2003. Bird extinctions in Atlantic Forest fragments of the Viçosa region, southeastern Brazil. *Conservation Biology*, 17: 1827-1839.

Richards LA and Coley P 2007 *Seasonal and habitat differences affect the impact of food and predation on herbivores: a comparison between gaps and understory of a tropical forest*. *Oikos* 116:31-40.

Rocha-Ortega M, Bartimachi A, Neves J, Bruna EM, Vasconcelos HL 2017 *Seed removal patterns of pioneer trees in an agricultural landscape*. *Plant Ecology* 218, 737-748.

Rodrigues RR et al. 2009 *On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest*. *Biological Conservation* 142:1242–1251.

Rodrigues, R.C. & et al. 2019. ATLANTIC BIRD TRAITS: a data set of bird morphological traits from the Atlantic forests of South America. *Ecology*, 100:e02647.

Rodrigues, RR, Lima, RAF, Gandolfi, S, Nave, AG. 2009. *On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest*. *Biological Conservation* 142: 1242–1251.

Rodrigues, RR; Brancalion, PHS; Isernhagen, I. 2009. *Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos*

conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo: LERF/ESALQ: Instituto BioAtlântica.

Rodrigues, RR; Gandolfi, S; Nave, AG; Aronson, J; Barreto, TE; Vidal, CY; Brancalion, PH. 2011. Large-scale ecological restoration of high-diversity tropical forests in SE Brazil. *Forest Ecology and Management* 261 1605–1613.

Rodríguez-Flores, C.I.; Ornelas, J.F.; Wethington, S. & Arizmendi, M.C. 2019. Are hummingbirds generalists or specialists? Using network analysis to explore the mechanisms influencing their interaction with nectar resources. *PLoS ONE*, 14:e0211855.

Roslin T, Hardwick B, Novotny V, Petry WK, Andrew NR, Asmus A, Barrio IC, Basset Y, Boesing AL, Bonebrake TC, Cameron EK, Dáttilo W, Donoso DA, Drozd P, Gray CL, Hik DS, Hill SJ, Huang THS, Koane B, Laird-Hopkins B, Laukkanen L, Lewis OT, Milne S, Mwesige I, Nakamura A, Nell CS, Nichols E, Prokurat A, Sam K, Schmidt NM, Slade A, Slade V, Suchanková A, Teder T, van Nouhuys S, Vandvik V, Weissflog A, Zhukovich V, Slade EM 2017 Higher predation risk for insect prey at low latitudes and elevations. *Science* 356, 742–744

Rother, DC, Liboni, AP, Magnago, LFS, Chao, A, Chazdon, RL, Rodrigues, RR, 2019. Ecological restoration increases conservation of taxonomic and functional beta diversity of woody plants in a tropical fragmented landscape. *Forest Ecology and Management*. v.451, p.117538.

Rother, DC, Vidal, CY, Fagundes, IC, Metran da Silva, Gandolfi, S, Rodrigues, RR, Nave, AG, Viani, RAG, Brancalion, PHS, 2018. How legal-oriented restoration programs enhance landscape connectivity? Insights from the Brazilian Atlantic Forest. *Trop. Conserv. Sci.* 11, <http://dx.doi.org/10.1177/1940082918785076>, 1940082918785076.

Rueda-Almonacid JV, Carr JL, Mittermeier RA, Rodriguez-Mahecha JV, Mast RB, Vogt RC, Rhodin AGJ, Ossa-Velasquez J, Rueda JN, Mittermeier CG 2007 Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del Trópico. Bogotá: Conservación Internacional.

Ryazanova GI, Polygalov AS 2013 Fluctuating asymmetry of wing venation in damselflies *Ischnura elegans* Odonata, Coenagrionidae and prospects of its use as a biological indicator of ecological quality of fresh-water reservoirs. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 68:195-199.

Saaty RW. The analytic hierarchy process—what it is and how it is used. *Mathematical Modelling*. 1987;9:161-76.

Saaty TL. A scaling method for priorities in hierarchical structures. *Journal of Mathematical Psychology*. 1977;15:234-81.

Sabino, U.; Morais, R. & Duca, C. 2017. Diet of some passerines in south coast of Espírito Santo State, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 57:387-391.

Sahlén G, Ekestubbe K 2001 Identification of dragonflies Odonata as indicators of general species richness in boreal forest lakes. *Biodiversity & Conservation* 10: 673-690.

Salas-Luévano MA, Mauricio-Castillo JA, González-Rivera ML, Vega-Carrillo HR, Salas-Muñoz S 2017

Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences* 76: 806.

Salomão RP, González-Tokman D, Dáttilo W, López-Acosta JC, Favila ME 2018 Landscape structure and composition define the body condition of dung beetles Coleoptera: Scarabaeinae in a fragmented tropical rainforest. *Ecological Indicators* 88:144-151.

Sam K, Rimmel T, Molleman F 2015 Material affects attack rates on dummy caterpillars in tropical forest where arthropod predators dominate: an experiment using clay and dough dummies with green colourants on various plant species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 157:317-324.

Samways MJ, Sharratt NJ 2010 Recovery of endemic dragonflies after removal of invasive alien trees. *Conservation Biology* 24:267–277.

Sánchez LE, Alger K, Alonso L, Barbosa F, Brito MCW, Laureano FV, May P, Roeser H, and Kakabadse Y. 2018 Os impactos do rompimento da Barragem de Fundão: O caminho para uma mitigação sustentável e resiliente. União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais UICN, Gland, Suíça.

Sánchez LE, Alonso L, Barbosa F, Brito MCW, Laureano FV, May P, and Kakabadse Y. 2019 Uma estrutura de avaliação dos impactos ambientais e sociais de desastres. Garantindo a mitigação efetiva após o rompimento da Barragem de Fundão. Painel do Rio Doce Questões em Foco NO 4. UICN, Gland, Suíça.

Sánchez LE. 2008 Avaliação de Impacto Ambiental: conceitos e métodos. Oficina de Textos, São Paulo

Sang W, Xu J, Bashir, MH, Ali S. 2018. Developmental responses of *Cryptolaemus montrouzieri* to heavy metals transferred across multi-trophic food chain. *Chemosphere*, 205: 690-697

Santos OSH, Avellar FC, Alves M, Trindade RC, Menezes MB, Ferreira MC, Moura PM 2019 Understanding the environmental impact of a mine dam rupture in Brazil: Prospects for remediation. *Journal of Environmental Quality* 48: 439-449.

Santos, P.M.; Bailey, L.L.; Ribeiro, M.C.; Chiarello, A.G.; Paglia, A.P. 2019. Living on the edge: Forest cover threshold effect on endangered maned sloth occurrence in Atlantic Forest. *Biological Conservation*, v. 240: 108264

Shepard AM, Mitchel TS, Henry SB, Oberhauser KS, Kobiela ME, Snell-Rood NE. 2020. Assessing zinc tolerance in two butterfly species: consequences for conservation in polluted environments. *Insect Conservation and Diversity*, doi: 10.1111/icad.12404

Schleuning M, Frund J, Klein AM, Abrahamczyk S, Alarcón R, Albrecht M, Andersson GKS, Bazarian S, Bohning-Gaese K, Bommarco R, Dalsgaard B, Dehling DM, Gotlieb A, Hagen M, Hickler T, Holzschuh A, Kaiser-Bunbury CN, Kreft H, Morris RJ, Sandel B, Sutherland WJ, Svenning JC, Tschardt T, Watts S, Weiner CN, Werner M, Williams NM, Winqvist C, Dormann CF, Bluthgen N 2012 Specialization of mutualistic interaction networks decreases toward tropical latitudes. *Current Biology* 22:1925–1931.

Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.

Nature Methods 9:671–675.

Schubart, O.; Aguirre, Á.C. & Sick, H. 1965. Contribuição para o conhecimento da alimentação das aves brasileiras. *Arquivos de Zoologia*, 12:95-249.

Schuchmann, K.-L. 1999. Family Trochilidae Hummingbirds. In: del Hoyo, J.; Elliott, A. & Sargatal, J. Eds., *Handbook of the birds of the World*, vol. 5, Barn-owls to Hummingbirds. Lynx Edicions, Barcelona, p.468-680.

Scotti MR, Gomes AR, Lacerda TJ, Ávila SS, Silva SL, Antão A, Rigobelo EC 2020 Remediation of a riparian site in the Brazilian Atlantic forest reached by contaminated tailings from the collapsed Fundão dam with native woody species. *Integrated Environmental Assessment and Management* 00: 1-11.

Segura FR, Nunes EA, Paniz FP, Paulelli ACC, Rodrigues GB, Braga GÚL, dos Reis Pedreira Filho W, Barbosa F, Cerchiaro G, Silva FF, Batista BL 2016 Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst Bento Rodrigues, Brazil. *Environ. Pollut.* 218: 813–825.

Sertorio MN, Souza ACF, Bastos DSS, Santos FC, Ervilha LOG, Fernandes KM, de Oliveira LL, Machado-Neves M. 2019. Arsenic exposure intensifies glycogen nephrosis in diabetic animals. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:12459–12469.

Shen ZJ, Chen YS, Zhang Z 2017 Heavy metals translocation and accumulation from the rhizosphere soils to the edible parts of the medicinal plant Fengdan *Paeonia ostii* grown on a metal mining area, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143: 19-27.

Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 862 p.

Siddig AAH, Ellison AM, Ochs A, Villar-Leeman C, Lau MK 2016 How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in *Ecological Indicators*. *Ecological Indicators* 60:223-230.

Silva D, Bellato C, Marques Neto J, Fontes M 2018 Trace elements in river waters and sediments before and after a mining dam breach Bento Rodrigues, Brazil. *Quim. Nova* 41: 857–866.

Silva JO, Espírito-Santo MM, Melo GA 2012 Herbivory on *Handroanthus ochraceus* Bignoniaceae along a successional gradient in a tropical dry forest. *Arthropod-Plant Interactions* 6:45-57

Silva, B.G.; Koch, I. & Piratelli, A.J. 2020. Fruit and flower availability affect bird assemblages across two successional stages in the Atlantic Forest. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 55: <https://doi.org/10.1080/01650521.2020.1743550>.

Silva, J.M.C. & Tabarelli, M. 2000. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. *Nature*, 404: 72-74.

Silva, J.M.C.; Souza, M.C. & Castelleti, C.H.M. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13:85-92.

Simmons, B.I.; Sutherland, W.J.; Dicks, L.V.; Albrecht, J.; Farwig, N.; García, D.; Jordano, P. & González-Varo,

J.P. 2018. Moving from frugivory to seed dispersal: Incorporating the functional outcomes of interactions in plant–frugivore networks. *Journal of Animal Ecology*, 87:995-1007.

Simpson SJ, Clissold FJ, Lihoreau M, Ponton F, Wilder SM, Raubenheimer D. 2015 Recent advances in the integrative nutrition of arthropods. *Annual Review of Entomology* 60:1-19.

Skutsch MM, and Flowerdew RTN 2009 Measurement Techniques in Environmental Impact Assessment. *Environmental Conservation* 3:209-217.

Sloan S, Meyfroidt P, Rudel TK, Bongers F, Chazdon R 2019 The forest transformation: Planted tree cover and regional dynamics of tree gains and losses. *Global Environmental Change* 59:101988.

Soares, E.S. & Anjos, L. 1999. Efeito da fragmentação florestal sobre aves escaladoras de tronco e galho na região de Londrina, norte do Estado do Paraná, Brasil. *Ornitologia Neotropical*, 10: 61-68.

Sober, E. 2015. *Ockham's Razors: A User's Manual*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781107705937.

Söderman F, van Dongen, S, Pakkasmaa S, Merilä J. 2007. Environmental stress increases skeletal fluctuating asymmetry in the moor frog *Rana arvalis*. *Oecologia* 151: 593–604.

Solar, R., Barlow, J., Ferreira, J., Berenguer, E., Lees, A.C., Thomson, J.R., Louzada, J., Maués, M., Moura, N.G., Oliveira, V.H.F., Chaul, J.C.M., Schoereder, J.H., Vieira, I.C.G., Mac Nally, R. and Gardner, T.A. 2015, How pervasive is biotic homogenization in human-modified tropical forest landscapes?. *Ecol Lett*, 18: 1108-1118. <https://doi.org/10.1111/ele.12494>

Soltani N, Keshavarzi B, Moore F, Sorooshian A, Ahmadi MR 2017 Distribution of potentially toxic elements PTEs in tailings, soils, and plants around Gol-E-Gohar iron mine, a case study in Iran. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 18798-18816.

Sorensen JC 1971 A framework for identification & control of resource degradation & conflict in the multiple use of the coastal zone. Dept. of Landscape Architecture, University of California, Berkeley

Souza ACF, Bastos DSS, Santos FC, Sertorio MN, Ervilha LOG, Gonçalves RV, de Oliveira LL, Machado-Neves M. 2018. Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. *Life Sciences*, 209:472-480.

Souza FL, ABE, AS 2001 Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 36: 57-62.

Souza FL, Raizer J, Costa HTM, Martins FI. 2008. Dispersal of *Phrynops geoffroanus* Chelidae in an Urban River in Central Brazil *Chelonian Conservation and Biology* 7: 257–261.

Souza JLP, Baccaro FB, Landeiro VL, Franklin E, Magnusson WE, Pequeno, PACL and Fernadnes IO 2015. Taxonomic sufficiency and indicator taxa reduce sampling costs and increase monitoring effectiveness for ants. *Diversity and Distributions* 22:111–122.

Souza, FL, Abe AS 2001. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 36: 57-62.

Stéphane Dray, David Bauman, Guillaume Blanchet, Daniel Borcard, Sylvie Clappe, Guillaume Guenard, Thibaut Jombart, Guillaume Laroque, Pierre Legendre, Naima Madi and Helene H Wagner 2020. *adespatial: Multivariate Multiscale Spatial Analysis*. R package version 0.3-8. <https://CRAN.R-project.org/package=adespatial>

Stiles, F.G. 1981. Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 68:323-351.

Strassburg, BBN, Beyer, HL, Crouzeilles, R, Iribarrem, A, Barros, F, Siqueira, MFde, Sánchez-Tapia, A, Balmford, A, Sansevero, JBB, Brancalion, PHS, Broadbent, NE, Chazdon, RL, Filho, AO, Gardner, TA, Gordon, A, Latawiec, A, Loyola, R, Metzger, JP, Mills, M, Possingham, HP, Rodrigues, RR, Scaramuzza, CAM, Scarano, FR, Tambosi, L, Uriarte, M. 2019. Strategic approaches to restoring ecosystems can triple conservation gains and halve costs. *Nature Ecology & Evolution* 3:62-70.

Sulkowski M, Hirner AV 2006 Element fractionation by sequential extraction in a soil with high carbonate content. *Appl. Geochem.* 21:16-28, 10.1016/j.apgeochem.2005.09.016

Sun H, Liu Y, Zhang G. 2006. Effects of heavy metal pollution on insects. *Acta Entomologica Sinica* 50: 178-185.

Sutherland, W.J.; Newton, I. & Green, R.E. 2004. *Bird ecology and conservation: a handbook of techniques*. Nova Iorque: Oxford University Press, 386 p.

Sydenham MA, Moe SR, Stanescu-Yadav DN, Totland Ø, Eldegard K 2016 The effects of habitat management on the species, phylogenetic and functional diversity of bees are modified by the environmental context. *Ecology and Evolution* 6:961-973.

Szentgyorgyi H, Moron D, Nawrocka A, Tofilski A, Woyciechowski M. 2017. Forewing structure of the solitary bee *Osmia bicornis* developing on heavy metal pollution gradient. *Ecotoxicology* 26:1031-1040.

Taylor GJ, Crowder AA 1983 Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. *Am J Bot* 70:1254–1257

Temperton, V.M.; Baasch, A.; Von Gillhausen P. & Kirmer, A. 2016. *Assembly Theory for Restoring Ecosystem Structure and Functioning: Timing is Everything? Foundations of Restoration Ecology*, 2nd edition ed M.P.J.Z.D. Falk.

Thompson JN. 2005 *The geographic mosaic of coevolution*. Chicago: University of Chicago Press.

Thompson MA 1990 Determining Impact Significance in EIA: a Review of 24 Methodologies. *Journal of Environmental Management* 30:235-250

Tibcherani M, Nacagava VAF, Aranda R, Mello RL. 2018. Review of Ants Hymenoptera:Formicidae as

bioindicators in the Brazilian Savanna. *Sociobiology* 65:112-129.

Tinoco, B.A.; Santillán, V.E. & Graham, C.H. 2016. Land use change has stronger effects on functional diversity than taxonomic diversity in tropical Andean hummingbirds. *Ecology and Evolution*, 8:3478-3490.

Tuomisto, H. 2010. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography*, 33: 2-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.05880.x>

U.S. EPA. 2007 Method 3051A SW-846: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, and oils, Revision 1. Washington, DC

Uehara-Prado M, Bello ADM, Fernandes JDO, Santos AJ, Silva IA, Cianciaruso MV 2010 Abundance of epigeaic arthropods in a Brazilian savanna under different fire frequencies. *Zoologia* 27:718-724.

Uehara-Prado M, Rineiro DB 2012 Borboletas em Floresta Atlântica: métodos de amostragem e inventário de espécies na Serra do Itapeti. Pages 167-186 In: Morini M SC, Mmiranda VPO eds Serra do Itapeti: aspectos históricos, sociais e naturalísticos. Bauru: Canal6.

Uezu, A. & Metzger, J.P. 2011. Vanishing bird species in the Atlantic Forest: relative importance of landscape configuration, forest structure and species characteristics. *Biodiversity and Conservation*, 20: 3627-3643.

Uezu, A. & Metzger, J.P. 2016. Time-lag in responses of birds to Atlantic Forest fragmentation: restoration opportunity and urgency. *PLoS ONE*, 11: e0147909. doi:10.1371/journal.pone.0147909.

Uezu, A.; Beyer, D.D. & Metzger, J.P. 2008. Can agroforest woodlots work as stepping stones for birds in the Atlantic forest region? *Biodiversity and Conservation*, 17: 1907-1922.

Uezu, A.; Metzger, J.P. & Vielliard, J.M.E. 2005. Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. *Biological Conservation*, 123: 507-519.

United Nations. Paris Agreement. 2015. Disponível em: <https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement/the-paris-agreement>. Acesso em 27 jan. 2020.

Ure AMM, Quevauviller P, Muntau H, Griepink B 1993 Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51:135-151, 10.1080/03067319308027619

Van Dongen S 2006 Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, presente and future. *Journal of Evolutionary Biology*: 1727–1743.

Van Poucke E, Van Nuffel A, Van Dongen S, Sonck B, Lens L, Tuytens FAM 2007. Experimental stress does not increase fluctuating asymmetry of broiler chickens at slaughter age. *Poultry Science* 86: 2110–2116.

Vera Y Conde, C. F.; Rocha, C. F. D. 2006. Habitat disturbance and small mammal richness and diversity in an Atlantic rainforest area in southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 66 4: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519->

69842006000600005.

Vergilio CS, Lacerda D, Oliveira BCV, Sartori E, Campos GM, Pereira ALS, Aguiar DB, Souza TS, Almeida MG, Thompson F, Rezende CE. 2020. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. *Sci. Rep.* 10: 1–12.

Viani, RAG, Holl, KD, Padovezi, A, Strassburg, BBN, Farah, FT, Garcia, LC, Chaves, RB, Rodrigues, RR, Brancalion, PHS. 2017. Protocol for Monitoring Tropical Forest Restoration. *Tropical Conservation Science.*, v.10: 1-8. DOI:10.1177/1940082917697265.

Vieira KIC, Da Luz CFP, Fidalgo ADO, Moreira NC, Resende HC. 2020. Floral resources used by *Tetragonisca angustula* Latreille 1811 in areas under the influence of the breach of the Fundão Dam in Mariana Minas Gerais, Brazil. *Grana*: 1-31.

Vieira, E.M. e Monteiro-Filho, E.L.A. 2003. Vertical stratification of small mammals in the Atlantic rain forest of south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 19: 501-507.

Vieira, L.A.A. 2017. Avaliação dos efeitos do uso de sete espécies de adubação verde na restauração florestal. 71f. Ensaio técnico apresentado para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal, ESALQ, USP, Piracicaba.

Vieira, M.F.; Mattos, G.T. & Carvalho-Okano, R.M. 1992. *Mabea fistulifera* Euphorbiaceae na alimentação de aves na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 73: 65-68.

Vielliard, J.M.E.; Almeida, M.E.C.; Anjos, L. & Silva, W.R. 2010. Levantamento quantitativo por pontos de escuta e o Índice Pontual de Abundância IPA. In: Matter, S.V.; Straube, F.C.; Accordi, I.; Piacentini, V. & Cândido-Jr, J.F. eds. *Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento*. Rio de Janeiro: Technical Books, p. 45-60.

Vuilleumier, F. 1997. An overview of field guides to neotropical birds with remarks on their role in the development of neotropical ornithology. *Ornitología Neotropical*, 8: 195-236.

Wagner, F.H; Sanchez, A; Aidar, M.P.M.; Rochelle, A.L.C.; Tarabalka, Y.; Fonseca, M.G.; Phillips, O.L.; Gloor, E.; Aragão, L.E.O.C. 2020. Mapping Atlantic rainforest degradation and regeneration history with indicator species using convolutional network. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229448>

Weidlich, E.W.A.; Von Gillhaussen, P.; Delory, B.M; Blossfeld, S.; Poorter H.; Temperton, V.M. 2017. The Importance of Being First: Exploring Priority and Diversity Effects in a Grassland Field Experiment. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-12, 2017.

Whitelaw K. 2004 *ISO 14001: Environmental Systems Handbook*. Elsevier Butterworth-Heinemann, Burlington

Whittaker, R. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21:213–251.

Wiki Aves. 2020. Wiki Aves - a enciclopédia das aves do Brasil. Disponível em: <<http://www.wikiaves.com>>. Acesso em: 20 de julho de 2020.

Willis, E.O. & Oniki, Y. 2002. Birds of Santa Teresa, Espírito Santo, Brazil: do humans add or subtract species? *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo, 42: 193-264.

Willis, E.O. 1979. The composition of avian communities in remanescent woodlots in southern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo, 33: 1-25.

Wilman, H.; Belmaker, J.; Simpson, J.; de la Rosa, C.; Rivadeneira, M.M. & Jetz, W. 2014. EltonTraits 1.0: Species-level foraging attributes of the world's birds and mammals. *Ecology*, 95:2027.

Wilsey B.J.; Barber K.; Martin L.M. 2015. Exotic grassland species have stronger priority effects than natives regardless of whether they are cultivated or wild genotypes. *New Phytologist*, 205: 928–937.

Wilson, D.E., Reeder, D.M. 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3ª edição. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 2.142 pp.

Windig JJ, Rintamaki WPT, Cassel A, Nylin S 2000 How useful is fluctuating asymmetry in rare and abundant *Coenonympha* butterflies. *Journal of Insect Conservation* 4:253-261.

Wu P, Axmacher JC, Song X, Zhang X, Xu H, Chen C, Yu Z, Liu Y 2018 Effects of plant diversity, vegetation composition, and habitat type on different functional trait groups of wild bees in rural Beijing. *Journal of Insect Science* 18:1.

Young, T.P.; Stuble, K.L.; Balachowski, J.A.; Werner, C.M. 2017. Using priority effects to manipulate competitive relationships in restoration. *Restoration Ecology*, 25 S2, S114–S123.

Zachos FE, Hartl GB, Suchentrunk F 2007 Fluctuating asymmetry and genetic variability in the roe deer *Capreolus capreolus*: a test of developmental stability hypothesis in mammals using neutral molecular markers. *Heredity* 98: 392–400.

Zago VCP, das Dores NC, Watts BA 2019 Strategy for phytomanagement in an area affected by iron ore dam rupture: A study case in Minas Gerais State, Brazil. *Environmental Pollution* 249: 1029-1037.

Zayed A, Gowthaman S, Terry N 1998 Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J Environ Qual* 27:715–721

Zvereva E, Castagneyrol B, Cornelissen T, Forsman A, Hernandez-Aguero JA, Klenola T, Paolucc L, Polo V, Salinas N, Theron KJ, Xu G, Zverev V, Kozlov M 2019. Opposite latitudinal patterns for bird and arthropod predation revealed in experiments with differently colored artificial prey. *Ecology and Evolution* 9: 14273-14285.