



FUNDAÇÃO
renova

**PLANO DE TRABALHO - ATENDIMENTO À CLÁUSULA 165 DO TERMO DE
TRANSAÇÃO E DE AJUSTAMENTO DE CONDUTA**

Outubro/2017

**ATENDIMENTO À CLÁUSULA 165 DO TERMO DE TRANSAÇÃO E DE
AJUSTAMENTO DE CONDUTA**

PLANO DE TRABALHO

RESUMO

Neste Plano são apresentadas as metodologias a serem utilizadas para cumprimento da Cláusula 165 do TTAC, em acordo com o item II, alíneas “a” e “b” da referida Cláusula, com o Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4) e com a Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio. O TR4 é bastante abrangente em seu conteúdo: apresenta oito anexos que tratam de diferentes linhas de estudo para monitoramento da biodiversidade aquática, análises ecotoxicológicas e de bioacumulação e de qualidade de água e sedimentos nos ambientes de manguezais, praias e áreas de foz, estuarinas e marinhas.

Palavras-chave: Biodiversidade, análises, monitoramento.

EQUIPE TÉCNICA RESPONSÁVEL POR ESTE PLANO DE TRABALHO

Profissional	Formação, Cargo/Função	Atividades
Bruno Vergueiro Silva Pimenta	Biólogo, Doutor em Zoologia, Líder de Programas Socioambientais	Elaboração do Plano de Trabalho
Rodolfo Campos Messner Pessoti	Biólogo, Mestre em Ecologia, Especialista de Programas Socioambientais	Elaboração do Plano de Trabalho
Laila Carine Campos Medeiros	Bióloga, Doutora em Ecologia de Ecossistemas, Analista de Programas Socioambientais	Elaboração do Plano de Trabalho
Juliana Oliveira Lima	Bióloga, Mestre em Microbiologia, Analista de Programas Socioambientais	Elaboração e formatação do Plano de Trabalho
Sara Juarez Sales	Engenheira Agrônoma, Gerente Executiva de Programas Socioambientais	Coordenação do Plano de Trabalho



Serviço Público Federal
CONSELHO FEDERAL/CONSELHO REGIONAL DE BIOLOGIA -
4ª REGIÃO

Situação: TRABALHO EM ANDAMENTO		Data: 28/07/2017 08:40:59	
ANOTAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA - ART		Nº: 2017/00739	
CONTRATADO			
Nome: BRUNO VERGUEIRO SILVA PIMENTA		Registro CRBio: 030454/04-D	
CPF: 03466010616		Tel: 36465898	
E-mail: bvergueiropimenta@gmail.com			
Endereço: R MANILA N.º 90, APT. 108, BL. 1			
Cidade: BELO HORIZONTE		Bairro: ESTRELA DALVA	
CEP: 30575-010		UF: MG	
CONTRATANTE			
Nome: Fundação Renova			
Registro profissional:		CPF/CGC/CNPJ: 25.135.507/0001-83	
Endereço: Av. Getúlio Vargas, 671 Sala 400			
Cidade: BELO HORIZONTE		Bairro: SAVASSI	
CEP: 30112-021		UF: MG	
Site:			
DADOS DA ATIVIDADE PROFISSIONAL			
Natureza: Ocupação de Cargo/Função - Cargo/função técnica *			
Identificação: Especialista em Programas Socioambientais			
Município do trabalho: Bacia do rio Doce e região costeira e estuarina da foz		UF: MG	Município da sede: Belo Horizonte
Forma de participação: Individual		Perfil da equipe:	
Área do conhecimento: Ecologia		Campo de atuação: Meio ambiente	
Descrição sumária da atividade: GERIR E EXECUTAR AS MEDIDAS PREVISTAS NOS PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS EM DECORRÊNCIA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO, AO LONGO DE TODA A ÁREA AFETADA. COORDENAR EQUIPE DE ESPECIALISTAS, ATUAR COMO GESTOR DE CONTRATOS, ANALISAR E ELABORAR DOCUMENTOS TÉCNICOS, PARTICIPAR DE DISCUSSÕES COM ÓRGÃOS AMBIENTAIS, CONSELHOS CONSULTIVOS E COLEGIADOS, FORNECEDORES E DEMAIS ATORES ENVOLVIDOS.			
Valor: R\$ 12218,00		Carga Horária Mensal: 170	
Início: 02/01/2017		Término:	
ASSINATURAS			
Declaro serem verdadeiras as informações acima			
Data: 02/01/2017 Assinatura do profissional		Data: / / Assinatura e carimbo do contratante	
Solicitação de baixa por distrato Data: / / Assinatura do profissional Data: / / Assinatura e carimbo do contratante		Solicitação de baixa por conclusão Declaramos a conclusão do trabalho anotado na presente ART, razão pela qual solicitamos a devida BAIXA junto aos arquivos desse CRBio. Nº do protocolo: 18950/NET Data: / / Assinatura do profissional Data: / / Assinatura e carimbo do contratante	

Para verificar a autenticidade desta ART acesse o **CRBio-04 Online** em nosso site e depois o serviço **Conferência de ART**



ANOTAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA - ART

1-ART Nº
2-23690/17-E

CONTRATADO

2.Nome: RODOLFO PESSOTTI MESSNER CAMPELO		3.Registro no CRBio-02: 48126
4.CPF: 09301642700	5.E-mail: campelorm@gmail.com	6.Tel: (27) 3019-5480 / 99755-7931
7.End.: R ARARIBOIA, 185		8.Bairro: CENTRO
9.Cidade: VILA VELHA	10.UF: ES	11.Cep: 29100340

CONTRATANTE

12.Nome: FUNDAÇÃO RENOVA	
13.Registro Profissional: 0	14.CPF/CNPJ: 25135507000183
15.End. AV: GETÚLIO VARGAS, 671, SALA 400	
16.Tel / E-mail: 03132899889 / ouvidoria@fundacaorenova.org	17.Bairro: SAVASSI
18.Cidade: BELO HORIZONTE	19.UF: MG
20.CEP: 30112021	

DADOS DA ATIVIDADE PROFISSIONAL

21.1 Natureza:	21.2 Ocupação de Cargo/Função: a - Cargo/função técnica
22. Identificação: ESPECIALISTA EM PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS	
23. Localização Geográfica: 23.1- do Trabalho: ES 23.2 - da Sede: MG	
24 - UF: ES	
25.Forma de participação: Individual	26.Perfil da equipe: N/D
27.Área do Conhecimento: Ecologia	28.Campo de Atuação: Meio Ambiente e Biodiversidade Gestão Ambiental
29.Descrição Sumária: EXECUTAR AS MEDIDAS PREVISTAS NOS PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS EM DECORRÊNCIA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO - MG, AO LONGO DE TODA A ÁREA AFETADA; ATUAR COMO GESTOR DE CONTRATOS E AUXILIAR NA GESTÃO DOS PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS; ANALISAR E ELABORAR DOCUMENTOS TÉCNICOS; PARTICIPAR DE DISCUSSÕES COM ÓRGÃOS AMBIENTAIS, CONSELHOS CONSULTIVOS E COLEGIADOS, FORNECEDORES E DEMAIS ATORES ENVOLVIDOS.	

30.Valor: R\$ 0,00	31.Total de horas: 170	32.Início: 7/11/2016 00:00:00	33.Término:
--------------------	------------------------	-------------------------------	-------------

34.ASSINATURAS

Declaro serem verdadeiras as informações acima.

Data: 07 / 11 / 2016

Data: / /

Assinatura do Profissional

Assinatura e Carimbo do Contratante

35. CARIMBO DO CRBio:
Para autenticação da ART:
<http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx>
código **2017073019282623690**

Marcelo Figueiredo
Diretor de Programas

36. SOLICITAÇÃO DE BAIXA POR CONCLUSÃO
Declaramos a conclusão do trabalho anotado na presente ART, razão pela qual solicitamos a devida BAIXA junto aos arquivos do CRBio-02.

37. SOLICITAÇÃO DE BAIXA POR DISTRATO

Data: / /	Assinatura do Profissional	Data: / /	Assinatura do Profissional
Data: / /	Assinatura e Carimbo do Contratante	Data: / /	Assinatura e Carimbo do Contratante

Para autenticação do conteúdo acesse:
<http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx> e informe o código
2017073019282623690
Nº Boleia Gerada 28078380000010469 | Situação da ART: Ativa
Esta ART deve sempre ser acompanhada do recibo de pagamento do respectivo emolumento de emissão

ART Eletrônica emitida em 30/7/2017 19:28:26
Impressão efetuada em 1/8/2017 11:06:45



Antarquia Federal
CONSELHO FEDERAL DE BIOLOGIA
CONSELHO REGIONAL DE BIOLOGIA 2ª REGIÃO RJ/ES



ANOTAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA - ART

1-ART N°
2-23702/17-E

CONTRATADO

2.Nome: LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS		3.Registro no CRBio-02: 78002
4.CPF: 11950964701	5.E-mail: lailamsv@gmail.com	6.Tel: (027) 30634276 / (027) 99731-3121
7.End.: RUA CEARÁ 332 APT 103 EDF VILA MARFIM		8.Bairro: PRAIA DA COSTA
9.Cidade: VILA VELHA	10.UF: ES	11.Cep: 29101290

CONTRATANTE

12.Nome: FUNDAÇÃO RENOVA	
13.Registro Profissional: 0	14.CPF/CNPJ: 25135507000183
15.End. AV. GETÚLIO VARGAS 671 SALA 400	
16.Tel / E-mail: (031)32899889 / ouvidoria@fundacaorenova.org	17.Bairro: SAVASSI
18.Cidade: BELO HORIZONTE	19.UF: MG
20.CEP: 30112021	

DADOS DA ATIVIDADE PROFISSIONAL

21.1 Natureza:	21.2 Ocupação de Cargo/Função: a - Cargo/função técnica
22. Identificação: ANALISTA DE PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS	
23. Localização Geográfica: 23.1- do Trabalho: ES 23.2 - da Sede: MG	
24 - UF: ES	
25.Forma de participação: Individual	26.Perfil da equipe: N/D
27.Área do Conhecimento: Ecologia ECOTOXICOLOGIA	28.Campo de Atuação: Meio Ambiente e Biodiversidade Biomonitoramento
29.Descrição Sumária: GERIR E EXECUTAR AS MEDIDAS PREVISTAS NOS PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS EM DECORRÊNCIA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO, AO LONGO DE TODA ÁREA AFETADA. COLETAR AMOSTRAS AMBIENTAIS, ATUAR COMO GESTORA DE CONTRATOS, ANALISAR E ELABORAR DOCUMENTOS TÉCNICOS, PARTICIPAR DE DISCUSSÕES COM ÓRGÃOS AMBIENTAIS, CONSELHOS CONSULTIVOS E COLEGIADOS, FORNECEDORES E DEMAIS ATORES ENVOLVIDOS.	
30.Valor: R\$ 0,00	31.Total de horas: 170
32.Início: 20/1/2017 00:00:00	33.Término:

34.ASSINATURAS

Declaro serem verdadeiras as informações acima.

Data: 20/01/2017 <i>Laila C. C. Medeiros</i> Assinatura do Profissional	Data: 1/1/17 <i>W. Ribeiro Aguiar</i> Assinatura e Carimbo do Contratante	35. CARIMBO DO CRBio: Para autenticação da ART: http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx código 2017080111131623702
---	---	--

36. SOLICITAÇÃO DE BAIXA POR CONCLUSÃO
Declaramos a conclusão do trabalho anotado na presente ART, razão pela qual solicitamos a devida BAIXA junto aos arquivos do CRBio-02.

37. SOLICITAÇÃO DE BAIXA POR DISTRATO

Data: ____/____/____ Assinatura do Profissional	Data: ____/____/____ Assinatura do Profissional
Data: ____/____/____ Assinatura e Carimbo do Contratante	Data: ____/____/____ Assinatura e Carimbo do Contratante

Para autenticação do conteúdo acesse: <http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx>
e informe o código **2017080111131623702**
Nº Boleta Gerada 28078380000010698 | Situação da ART: Aguardando Pagamento
Esta ART deve sempre ser acompanhada do recibo de pagamento do respectivo emolumento de emissão

ART Eletrônica emitida em 1/8/2017 11:13:16
Impressão efetuada em 1/8/2017 12:22:07



Serviço Público Federal
CONSELHO FEDERAL/CONSELHO REGIONAL DE BIOLOGIA -
4ª REGIÃO

Situação: TRABALHO EM ANDAMENTO		Data: 01/08/2017 10:29:53	
ANOTAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA - ART			Nº: 2017/06037
CONTRATADO			
Nome: JULIANA OLIVEIRA LIMA		Registro CRBio: 057508/04-D	
CPF: 03173959639		Tel: 988277052	
E-mail: juolima@yahoo.com			
Endereço: AV PROFESSOR MARIO WERNECK - 1802/1904			
Cidade: BELO HORIZONTE		Bairro: ESTORIL	
CEP: 30455-610		UF: MG	
CONTRATANTE			
Nome: Fundação Renova			
Registro profissional:		CPF/CGC/CNPJ: 25.135.507/0001-83	
Endereço: Av. Getúlio Vargas, 671 Sala 400			
Cidade: BELO HORIZONTE		Bairro: SAVASSI	
CEP: 30112-021		UF: MG	
Site:			
DADOS DA ATIVIDADE PROFISSIONAL			
Natureza: Ocupação de Cargo/Função - Cargo/função técnica *			
Identificação: Analista de Programas Ambientais			
Município do trabalho: Bacia do rio Doce região costeira e estuarina da foz		UF: MG	Município da sede: Belo Horizonte
UF: MG		UF: MG	
Forma de participação: Individual		Perfil da equipe:	
Área do conhecimento: Ecologia		Campo de atuação: Meio ambiente	
Descrição sumária da atividade: GERIR E EXECUTAR AS MEDIDAS PREVISTAS NOS PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS EM DECORRÊNCIA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO, AO LONGO DE TODA A ÁREA AFETADA. ATUAR NA ELABORAÇÃO, REVISÃO E ANÁLISE DE DOCUMENTOS TÉCNICOS, PARTICIPAR DE DISCUSSÕES COM ÓRGÃOS AMBIENTAIS, FORNECEDORES E DEMAIS ATORES ENVOLVIDOS.			
Valor: R\$ 6022,00		Carga Horária Mensal: 170	
Início: 11/05/2017		Término:	
ASSINATURAS			
Declaro serem verdadeiras as informações acima			
Data: 01/08/2017 Juliana Oliveira Lima Assinatura do profissional		Data: / / Marcelo Figueiredo Assinatura e carimbo do contratante	
Solicitação de baixa por distrato		Solicitação de baixa por conclusão	
Data: / / Assinatura do profissional Data: / / Assinatura e carimbo do contratante		Declaramos a conclusão do trabalho anotado na presente ART, razão pela qual solicitamos a devida BAIXA junto aos arquivos desse CRBio. Nº do protocolo: 25753/NET Data: / / Assinatura do profissional Data: / / Assinatura e carimbo do contratante	

[Imprimir ART](#)

SUMÁRIO

1. SUMÁRIO EXECUTIVO	1
2. APRESENTAÇÃO.....	2
3. PREMISSAS	5
3.1 Coletas e Amostras	5
3.2 Prazos e Produtos	5
3.3 Execução dos Produtos e Qualificação das Instituições e Equipes	7
3.4 Recebimento, Armazenamento e Distribuição dos Dados	7
4. DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO	9
4.1 Item II da Cláusula 165	9
4.2 Anexo 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas	10
4.2.1 Objetivos	10
4.2.2 Área de Estudo	11
3.2.3 Metodologias e Periodicidade	15
4.3 Anexo 2 - Estudo e monitoramento do ambiente dulcícola da Área Ambiental I	39
4.3.1 Objetivos	40
4.3.2 Área de Estudo	40
4.3.3 Metodologias e Periodicidade	41
4.4 Anexo 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1).....	45
4.4.1 Objetivo.....	46
4.4.2 Área de Estudo	46
3.4.3 Metodologias e Periodicidade	48
4.5 Anexo 4 - Monitoramento de potenciais impactos do rejeito de minério de ferro na praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce	89
4.5.1 Objetivos	89
4.5.2 Área de Estudo	89

4.5.3 Metodologias	90
4.5.4 Periodicidade	96
4.5.5 Produtos	96
4.6 Anexo 5 - Alterações ecológicas na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce	97
4.6.1 Metodologia	97
4.7 Anexo 6 - Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio Doce, Plataforma Continental e áreas protegidas adjacentes	106
4.7.1 Objetivos	107
4.7.2 Área de Estudo	108
4.7.3 Metodologias	109
4.8 Anexo 7 - Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha e estuarina	135
4.8.1 Objetivos	135
4.8.2 Área de Estudo	136
4.8.3 Metodologias e Periodicidade	139
4.8.4 Produtos	148
4.9 Anexo 8 - Monitoramento da sedimentação no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e regiões relacionadas.....	148
4.9.1 Área de Estudo	149
4.9.2 Metodologias	150
5. CRONOGRAMA	156
6. EQUIPE EXECUTORA	157
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

1. SUMÁRIO EXECUTIVO

O presente Plano de Trabalho é apresentado pela Fundação Renova em atendimento à Cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta (TTAC) e à Deliberação nº 112 do Comitê Interfederativo (CIF), de 26 de setembro de 2017. Tem como objetivo reapresentar as metodologias propostas para cumprimento das alíneas “a” e “b” do item II da Cláusula 165 e dos Anexos do Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4), e seus respectivos cronogramas de execução.

A referida Deliberação determina que a Fundação Renova apresente adequação do Plano de Trabalho anteriormente apresentado conforme as recomendações da Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio. Esta Nota Técnica analisa ponto a ponto não só o atendimento à Deliberação nº 79 do CIF, mas também responde a questionamentos enviados pela Renova à Câmara Técnica de Conservação e Biodiversidade (CTBio) em 08/08/2017 por meio do Parecer Técnico “Questionamentos ao Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática”.

Ressalta-se que este Plano de Trabalho volta a descrever parte das ações referentes ao Anexo 2 do TR4, pois a Deliberação nº 112 do CIF determina, em seu item b, “Incluir os pontos de amostragem referentes aos ambientes dulcícolas no trecho capixaba do Rio Doce (pontos 17 a 22) previstos nos anexos 01 e 03 do Termo de Referência nº 04/2016” (*sic*), quais sejam, os pontos de amostragem do Anexo 2.

2. APRESENTAÇÃO

Neste Plano são descritas as metodologias a serem utilizadas para cumprimento da Cláusula 165 do TTAC, em acordo com seu item II, alíneas “a” e “b”, e com o TR4. O termo mencionado foi elaborado pelo ICMBio e recebido pela Fundação Renova em 20/10/2016. O TR4 é bastante abrangente em seu conteúdo: apresenta oito anexos que tratam de diferentes linhas de estudo para monitoramento da biodiversidade aquática, análises ecotoxicológicas e de bioacumulação e de qualidade de água e sedimentos. Por decisão da Deliberação nº 79 do CIF, este Plano de Trabalho contempla apenas parcialmente o Anexo 2 - Estudo e Monitoramento do Ambiente Dulcícola da Área Ambiental I, para que fossem incluídos os pontos de amostragem deste anexo que coincidem com a obtenção de amostras necessárias às análises previstas nos Anexos 1 e 3 do TR4 por determinação da Deliberação nº 112 do CIF.

O Plano também inclui cronogramas de execução dos estudos associados aos Anexos do TR4 descritos neste documento. Como forma de facilitar a análise, este Plano de Trabalho segue o ordenamento visto a seguir:

- a) Item II da Cláusula 165.
- b) Anexo 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas.
- c) Anexo 2 - Estudo e Monitoramento do Ambiente Dulcícola da Área Ambiental I.
- d) Anexo 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1).
- e) Anexo 4 - Monitoramento de potenciais impactos do rejeito de minério de ferro na praia e antepraia adjacentes da desembocadura do rio Doce.
- f) Anexo 5 - Alterações ecológicas na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do rio Doce.
- g) Anexo 6 - Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio Doce, plataforma continental e áreas protegidas adjacentes.
- h) Anexo 7 - Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha e estuarina.
- i) Anexo 8 - Monitoramento da sedimentação no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e regiões relacionadas.

j) Cronograma de Execução.

k) Equipe Executora.

A Fundação Renova propôs alterações das diretrizes do TR4, seja para ordenar o processo de formulação de hipóteses sobre a ocorrência de impactos ou para otimizar os recursos a serem disponibilizados para as atividades. O objetivo destes ajustes é contribuir para o aprimoramento técnico das ações previstas ao longo do monitoramento, de forma a buscar respostas assertivas sobre os impactos causados aos ambientes e à biota estuarina e marinha. Parte destas sugestões foi apresentada na segunda versão do Plano de Trabalho, aprovada com ressalvas pela Deliberação nº 112 do CIF, e outra parte no Parecer Técnico “Questionamentos ao Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática”. As modificações aceitas pela CTBio, conforme expostas na Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, foram integradas ao presente documento.

Os parâmetros propostos neste plano serão reavaliados ao término do primeiro ano de monitoramento, quando poderão sofrer adequações em função de:

- a) Relevância dos resultados obtidos em termos de respostas assertivas dos parâmetros quanto à identificação e mensuração dos impactos ambientais;
- b) Custos aplicados para monitoramento dos parâmetros;
- c) Necessidade de inclusão de novos parâmetros de monitoramento em decorrência dos resultados obtidos.

A avaliação acima citada será realizada por pesquisadores diretamente envolvidos nos monitoramentos, pesquisadores externos, Fundação Renova e CTBio. Seu produto será submetido ao CIF para avaliação.

Nesta versão do Plano de trabalho é acrescentado um item sobre “Premissas”, que versa sobre as condições gerais dos trabalhos a serem desenvolvidos. Este item apresenta condições para o desenvolvimento de todas as atividades, sendo que seu conteúdo permeia mais de um anexo e seus respectivos processos, como o depósito de amostras biológicas em coleções de referência.

Por último, as coordenadas dos pontos de amostragem apresentadas no TR4 possuem notações diferentes, ora sendo apresentadas em coordenadas decimais, ora em coordenadas geográficas, ora em UTM, e sem indicação do *datum*. Neste Plano de Trabalho todas as coordenadas foram convertidas para o *datum* SIRGAS2000 e são apresentadas sempre em UTM, da forma como serão apresentadas nos relatórios dos monitoramentos. Assumiu-se para esta conversão que o *datum* das coordenadas apresentadas no TR4 era SAD69, o mais comumente utilizado antes da adoção do SIRGAS2000.

3. PREMISSAS

3.1 Coletas e Amostras

Conforme solicitação do TR4, os organismos coletados ou suas partes (no caso de dentes ou outras partes ósseas, amostras de tecidos, penas, etc.) serão tombados em coleções de referência, preferencialmente de instituições de Minas Gerais ou Espírito Santo. O tombamento dos exemplares ou de suas partes deve ser feito acompanhado de informações sobre local de coleta (com as devidas coordenadas em UTM, datum SIRGAS2000), data de coleta, nome do coletor, método de coleta e outras observações relevantes. Para a obtenção de licenças ou autorizações de captura, coleta e transporte de material botânico ou zoológico, será apresentada ao órgão responsável carta de aceite da instituição depositária, explicitando a capacidade para recebimento e guarda do material em condições adequadas e disponibilizando sua consulta aos pesquisadores interessados, de forma que seja montado acervo capaz de atender a outros estudos pelo maior período de tempo que a preservação do material permitir.

O esforço de coleta bem e a integração dos resultados devem ser otimizados, de maneira a possibilitar maior eficiência aos estudos e a eutanásia do menor número possível de exemplares.

3.2 Prazos e Produtos

Os monitoramentos têm previsão de cinco anos de duração. O TR4 adiciona ao TTAC a necessidade de avaliação da continuidade do Programa após este período conforme checagem dos impactos detectados.

Durante o período dos monitoramentos, devem ser entregues relatórios semestrais para cada componente do Programa. Após a entrega destes relatórios, o TR4 prevê a realização de um *workshop* para avaliação técnico-científica dos resultados, podendo verificar a adequação do Programa e sua integração com as ações e resultados de outros projetos e estudos. A coordenação dos *workshops*, ainda conforme determinação do TR4, ficará a cargo do ICMBio em articulação com os demais órgãos ambientais.

É ainda prevista avaliação contínua do Programa de Monitoramento pelo Grupo Técnico de Acompanhamento, formado por técnicos a serem indicados pelo ICMBio, IBAMA e Secretarias Estaduais de Meio Ambiente dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Este grupo tem como atribuições:

- participar de *workshops* para avaliação técnico-científica dos resultados após a entrega dos relatórios semestrais;
- realizar a consolidação e análise interpretativa dos dados gerados pelo monitoramento em reuniões presenciais trimestrais, com duração mínima de dois dias;
- realizar, a seu exclusivo critério e a qualquer tempo ou oportunidade, avaliações técnicas nos laboratórios e participar das campanhas de monitoramento, devendo a Fundação Renova disponibilizar, sempre que solicitada, o planejamento das campanhas de monitoramento, de forma a permitir este acompanhamento.

O TR4 define que o custeio das despesas dos agentes públicos que irão compor o Grupo Técnico de Acompanhamento será feito pela Fundação Renova. É claro no TR o cunho de avaliação e fiscalização destas atividades. Cumpre informar que este tipo de custeio está em desacordo com as finalidades dos recursos destinados à instituição. Não obstante, o planejamento das campanhas será sempre fornecido aos órgãos ambientais.

O monitoramento terá caráter adaptativo, sendo possível propor alterações para as frequências de amostragem, número de estações/pontos/transectos de amostragem e análises a serem realizadas sempre que necessário. A Fundação Renova considera desejável que este tipo de avaliação seja feito minimamente ao final de cada ano do monitoramento, após a entrega dos relatórios, verificando a necessidade de melhor adequação do Programa aos seus objetivos. Recomenda-se que ao final do primeiro ano de monitoramento priorize-se a proposição de medidas reparatórias que já puderem ser relacionadas a impactos observados e mensurados ou, ao menos, de novas perguntas que possam direcionar as ações do Programa e torná-lo efetivamente capaz de oferecer respostas sobre a existência e dimensão de eventuais impactos sobre os diversos componentes sob análise.

3.3 Execução dos Produtos e Qualificação das Instituições e Equipes

A Fundação Renova está em fase final de negociações com a Fundação Espírito-Santense de Tecnologia (FEST), fundação de apoio universitário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), que será a entidade jurídica com a qual será firmado Acordo de Cooperação para a contratação do grupo de pesquisadores que serão responsáveis pela condução dos estudos. A FEST já informou à Renova, por meio de sua proposta técnica, quais serão os profissionais que irão coordenar os estudos relacionados neste Plano de Trabalho. A Renova fez a análise dos currículos e experiências destes profissionais, tendo aprovado tecnicamente todo o grupo apresentado. A relação destes profissionais, assim como as instituições a que estão afiliados e Anexos pelos quais serão responsáveis, é apresentada no item 6 deste documento, intitulado “Equipe Executora”.

3.4 Recebimento, Armazenamento e Distribuição dos Dados

O TR4 define que os dados brutos de todas as análises a serem realizadas por este Programa de Monitoramento devem ser enviados ao CIF, ICMBio, IBAMA e às Secretarias Estaduais de Meio Ambiente dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Os dados brutos serão armazenados e disponibilizados pela Fundação Renova em um banco de dados aberto a ser elaborado pela Fundação em atendimento às diretrizes apresentadas pela CTBio e CTFLOR. Os dados gerados devem ser divulgados pela Fundação através da Internet.

Este banco tem prazo de entrega de seis meses após o início dos monitoramentos previstos neste Plano de Trabalho e irá conter não só os dados referentes à Cláusula 165, mas também aqueles dos estudos relacionados às Cláusulas 164, 166 e 181.

Em reunião intercâmaras ocorrida em 25/10/2017, foi apresentado o planejamento para elaboração do sistema de banco de dados da Fundação Renova. Este mesmo planejamento foi apresentado ao CIF na reunião ordinária desta entidade, ocorrida em 23/10/2017, onde foram solicitadas correções e melhorias. Foi definido que serão discutidas as sugestões apresentadas pelo CIF e Câmaras Técnicas em novas reuniões coordenadas pela CTFLOR, sendo parte destas discussões o cronograma detalhado de desenvolvimento e apresentação da ferramenta. A

Fundação Renova irá manter a CTBio informada sobre estas definições e cronograma, para acompanhamento.

Até que esta etapa de desenvolvimento do Banco de Dados seja concluída, as informações geradas pelo Programa de Monitoramento serão disponibilizadas no sistema *WebGis* já em operação na Fundação Renova. Além disso, os dados brutos podem ser disponibilizados em planilhas Excel, csv ou outros formatos, conforme solicitação da CTBio.

4. DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO

4.1 Item II da Cláusula 165

O item II da Cláusula 165 solicita a apresentação de resultados de estudos para identificação e caracterização do impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho e de avaliação do habitat de fundo marinho, incluindo algas calcáreas, rodólitos e corais, nas áreas estuarinas, marinhas e da foz do rio atingidas pelo material oriundo do rompimento da barragem.

O estudo solicitado neste item do TTAC será elaborado a partir de informações de “linha de base”, ou seja, dados disponíveis em relatórios técnicos realizados pela Samarco, Fundação Renova, órgãos ambientais, órgãos governamentais de controle e fiscalização (p.ex., IGAM, ANA, CPRM) instituições de pesquisa, artigos, livros e outras fontes acerca das condições da biota e dos ambientes em períodos anterior e posterior ao rompimento da barragem. Este estudo deve apresentar, de forma clara e objetiva, as condições gerais destes componentes antes do rompimento e os impactos potenciais/verificados decorrentes da passagem da pluma de rejeitos nos ambientes dulcícola, estuarino e marinho.

Para a elaboração deste estudo, serão selecionados dados sobre:

- a) caracterização dos rejeitos liberados pelo rompimento da barragem;
- b) análises físico-químicas e impactos sobre a qualidade da água e sedimentos (rio Doce e mar);
- c) análises ecotoxicológicas, de biodisponibilidade e de bioacumulação nos rios, região estuarina, praias e organismos aquáticos;
- d) monitoramentos de fitoplâncton, zoobentos dulcícolas e de ictiofauna, ictioplâncton e carcinofauna estuarina e marinha adjacentes à foz do rio Doce;
- e) estudos sobre algas calcáreas e rodólitos na região da foz do rio Doce.

Outros estudos sobre temas afeitos ao objetivo deste documento podem ser acrescentados à análise, conforme disponibilidade, com o objetivo de enriquecer seu conteúdo e permitir conclusões mais acuradas.

Este estudo deverá contemplar o máximo possível de informações disponíveis nos períodos anterior e posterior ao evento, de forma a permitir comparações, inferências e a definição de ações que possam complementar suas conclusões ou a validação/propostas de melhorias para ações já previstas.

4.2 Anexo 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas

4.2.1 Objetivos

- a) Investigação dos efeitos causados pela exposição crônica e aguda ao sedimento e à água de regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas, através de testes de toxicidade em laboratório usando organismos como bioindicadores;
- b) Avaliação das concentrações de metais na água e em organismos aquáticos (água doce, estuarina e marinha) de diferentes níveis da cadeia trófica, incluindo os recursos pesqueiros (peixes e crustáceos), a avifauna, a mastofauna e a herpetofauna aquáticas;
- c) Análise de biomarcadores de exposição e efeito de metais em organismos aquáticos (água doce, estuarina e marinha) de diferentes níveis da cadeia trófica;
- d) Avaliação da microbiota e detecção de bioindicadores de impactos ambientais no sedimento e na água na Área Ambiental 1 e na região costeira adjacente à foz do rio Doce, bem como em corais de recifes próximos ao sul do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e recifes-controle fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos.

Ressalta-se que os objetivos do Anexo 1 mencionam avaliações e análises nos ambientes e organismos de água doce. A seleção de sítios de amostragem e metodologias de coleta nos ambientes dulcícolas é feita no Anexo 2 do TR4, que foi retirado do escopo deste Plano de

Trabalho pela Deliberação nº 79 do CIF. Desta maneira, este Plano de Trabalho descreve apenas os parâmetros e aspectos do Anexo 1 referentes aos ambientes estuarinos e marinhos. A coleta dos parâmetros no ambiente dulcícola irá aguardar a revisão do Anexo 2.

4.2.2 Área de Estudo

Conforme definido pelos Anexos 1 e 3 do TR4, amostras de água, sedimento e organismos seriam coletadas na bacia do rio Doce, na região estuarina, na região costeira e nas praias adjacente à sua foz. Com a exclusão dos ambientes dulcícolas de Minas Gerais, oriunda das decisões apresentadas nas Deliberações nº 112 e 113 do CIF, os pontos 1 a 16 dos Anexos 1 e 2 não são considerados neste Plano de Trabalho. São mantidos os pontos 17 a 26, pertencentes à porção capixaba do rio Doce e região estuarina (Quadro 1).

Quadro 1 - Pontos de amostragem do Anexo 1 - TR4 na porção capixaba do rio Doce e região estuarina.

Ponto	Local	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		X	Y
17	Rio Guandu	288351,08	7828746,17
18	Lagoa do Limão	355688,84	7837447,02
19	Lagoa Nova	377287,60	7855827,03
20	Lagoa Japarana	385766,88	7859664,14
21	Rio Doce	387144,67	7853249,98
22	Rio Doce	410025,62	7837309,00
23	Lagoa do Areão	411472,58	7835831,65
24	Lagoa do Areal	413154,34	7834176,33
25	Lagoa Monsaraz	415912,93	7837161,08
26	Foz do rio Doce	414079,86	7828234,12

Fonte: Anexo 1, TR4.

Na foz do rio Doce e região costeira adjacente é previsto um primeiro conjunto de 30 pontos de amostragem distribuídos por oito localidades (Quadro 2). Para este conjunto, o objetivo principal será “monitorar os parâmetros físico-químicos, investigar efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição crônica e aguda, a contaminação por metais e os efeitos biológicos da pluma de sedimentos a partir da foz do rio Doce”.

Quadro 2 - Pontos de amostragem do Anexo 1 - TR4 na foz do rio Doce e região costeira adjacente.

Localidade	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	X	Y
Vitória (ES)	373370,92	7759040,18
	378037,01	7755589,67
Barra Nova (São Mateus, ES)	435969,74	7903774,11
	462242,81	7903846,12
Abrolhos (BA)	532065,56	8010704,39
	525452,40	8022616,67
	475936,13	8017006,73
Itaúnas (Conceição da Barra, ES)	430449,20	7964547,90
	463552,34	7956840,44
Degredo (Linhares, ES)	429405,30	7864891,21
	451968,30	7856730,30
Foz do rio Doce (Linhares, ES)	428268,74	7842923,74
	427720,85	7832036,66
	417558,23	7826708,46
	422768,53	7819938,12
	407208,69	7805922,41
	399458,35	7814269,72
	384042,73	7790616,41
APA Costa das Algas e RVS Santa Cruz (Aracruz, ES)	404234,57	7791153,28
	386404,58	7782339,82
	401062,64	7777853,95
	407337,87	7772381,14
	411663,74	7782961,89
	391744,43	7787277,00
	411675,47	7795169,07
APA de Setiba (Guarapari, ES)	400469,81	7781684,29
	355156,85	7723667,77
	357393,32	7719405,95

Fonte: Anexo 1, TR4.

Nas praias adjacentes à foz do rio Doce as coletas terão como objetivo análise dos efeitos ecotoxicológicos oriundos da exposição crônica e aguda, análises da contaminação por metais e resposta de biomarcadores. A área de abrangência deste monitoramento químico e biológico serão as praias entre Aracruz e São Mateus. São propostas 10 estações de amostragem, incluindo áreas da Reserva Biológica (REBIO) de Comboios, da Área de Proteção Ambiental (APA) Costa das Algas e do Refúgio de Vida Silvestre (RVS) de Santa Cruz (Quadro 3).

Quadro 3 - Pontos de amostragem do Anexo 1 - TR4 nas praias adjacentes à foz do rio Doce.

Estações de Amostragem	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Aracruz 1: Refúgio	379908,15	7787892,37
Aracruz 2: Padres	382269,99	7795558,41
Doce Sul 1: Barra Do Riacho	389346,33	7807767,56
Doce Sul 2: Comboios	398483,36	7818546,19
Doce Sul 3: Regência	407416,09	7824460,93
Doce Norte 1: Povoação	417863,32	7834350,26
Doce Norte 2: Vila De Cacimbas	426646,32	7857980,26
Doce Norte 3: Pontal Do Ipiranga	425784,32	7877396,26
Doce Norte 4: Urussuquara	423026,32	7897769,26
Doce Norte 5: Guriri	421308,32	7929528,26

Fonte: Anexo 1, TR4.

As análises ecotoxicológicas em aves merecem delimitação de área de estudo particular por parte do Anexo 1. Isto é justificado pela variedade de hábitos destes animais, que se distribuem por regiões límnicas, estuarinas, costeiras e marinhas, e pela heterogeneidade ambiental das áreas afetadas. Dessa maneira, o Anexo 1 determina que as tendências nas eventuais concentrações de contaminantes em tecidos de aves sejam monitoradas em 13 áreas de amostragem distintas, sendo oito ao longo do rio Doce, uma em cada um dos ambientes estuarinos, de manguezais e costeiros, e duas áreas de amostragem marinhas. O Anexo 1 não fornece as coordenadas de localização destas áreas de amostragem, apesar da Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio mencionar que são indicadas na Tabela 3 do TR4, mas apresenta um mapa com polígonos delimitando as seguintes áreas:

- Rio Gualaxo do Norte
- Rio do Carmo (trecho afetado)
- Rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce)
- Rio Doce (à montante da foz do rio Corrente)
- Rio Doce (à montante da foz do rio Suaçuí Grande)
- Rio Doce (à montante da foz do rio Manhuaçu)
- Rio Doce (entre Colatina e Linhares)
- Rio Doce (entre Linhares e Regência)
- Estuário do rio Doce (Linhares)
- Manguezal na foz do rio Doce (Linhares)
- Costa adjacente à foz do rio Doce (norte e sul)
- Área marinha (amostragem a bordo)
- Abrolhos

Observou-se que as primeiras oito áreas listadas acima coincidem com a malha de amostragem proposta pelo Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO, que trata dos monitoramentos da fauna e flora terrestre no âmbito da Notificação IBAMA 678322-E, de 03/12/2015. Este Parecer foi enviado à Samarco em 08/06/2017 e seu Plano de Trabalho protocolado no IBAMA-ES em 23/06/2017. Posteriormente, o monitoramento de fauna e flora terrestre foi conjugado à Cláusula 168 do TTAC por meio da Deliberação nº 91 do CIF. Ressalta-se que o referido Parecer Técnico contempla a coleta de sangue e penas de aves para análise de metais. Dessa maneira, é configurada sobreposição de escopo entre os dois monitoramentos.

Esta e outras dúvidas levaram a Fundação Renova a enviar e-mail à CTBio, em 28/09/2017, uma lista de perguntas visando esclarecimento de alguns pontos da Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio. Especificamente sobre a coincidência parcial das malhas de amostragem do Anexo 1 e do Parecer Técnico, a Fundação sugeriu manter as oito áreas comuns aos dois documentos como escopo do Parecer Técnico, evitando sobreposição de esforços e otimizando os recursos que já serão mobilizados para o monitoramento de fauna terrestre na

coleta de penas, sangue e dos parâmetros de populações e comunidades. A CTBio concordou com a sugestão apresentada, conforme registrado na ata da 15ª Reunião Ordinária desta Câmara.

Dessa maneira, são mantidas no escopo do Anexo 1 do TR4 as áreas de amostragem de aves referentes ao estuário do rio Doce (Linhares), manguezal na foz do rio Doce (Linhares), costa adjacente à foz do rio Doce (norte e sul), área marinha (amostragem a bordo) e Abrolhos.

Os resultados das análises das amostras de sangue e penas de aves coletadas nas áreas de amostragem do monitoramento de fauna e flora e do Anexo 1, conforme revisão acima, deverão ser comparados com aqueles oriundos da análise de amostras de 10 exemplares por espécie que tenham sido coletados antes do rompimento da barragem.

3.2.3 Metodologias e Periodicidade

O monitoramento ecotoxicológico terá periodicidade sazonal (verão e inverno) em função da hidrodinâmica na região costeira, dependente do regime pluviométrico, e dos padrões de correntes marinhas.

- Amostras de água

Serão coletadas amostras de água em 10 pontos na porção capixaba da bacia do rio Doce, 30 pontos na foz do rio Doce, região estuarina e região costeira adjacente e 10 pontos nas praias, conforme Quadros 1, 2 e 3.

Em todos estes pontos deverão ser obtidas três amostras de superfície (0 a 15 cm de profundidade) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo, conforme profundidade do local de coleta) para análise das concentrações de metais (total e dissolvido). As amostras, cada uma com 10 mL, serão obtidas por meio de uma garrafa horizontal de Niskin, imediatamente acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas.

Além destas amostras, serão também obtidas três amostras de superfície e três de fundo, cada uma com 50 mL, de água filtrada em malha de 0,45 µm para análise das concentrações de

metais dissolvidos e carbono orgânico dissolvido. Estas também serão acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%), além de mantidas refrigeradas e na ausência de luz. Em todas as amostras serão analisadas as concentrações de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg).

- Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água da foz do rio Doce e região costeira

Os testes de ecotoxicidade demandam amostras adicionais às descritas para a análise química de água. Por isso, as amostras de água superficial e sedimento bruto deverão ser suficientes para todos os testes previstos no Anexo 1.

Deverão ser utilizadas metodologias para a condução de ensaios sobre a avaliação dos efeitos sobre a reprodução, fertilização e desenvolvimento de organismos sob diferentes vias de exposição (água bruta, sedimento inteiro e elutriato). Estes ensaios devem garantir a investigação completa dos potenciais impactos nos diversos níveis tróficos das áreas estudadas (dulcícola, estuarina e marinha). É franqueada preferência por organismos nativos típicos de cada área e que tenham procedimentos de ensaio já normatizados. Além destes, o Anexo 1 define a utilização de ensaios com *zebrafish* pelo fato da espécie ser um modelo consagrado para estudos de ecotoxicologia experimental envolvendo ovos, embriões e larvas. Porém, isso não exclui a necessidade de ensaios com espécies nativas.

- Amostras da biota aquática

Serão coletados exemplares de espécies típicas dos ambientes aquáticos para análise dos eventuais efeitos da contaminação da água por metais e sua acumulação nos organismos de diferentes níveis tróficos e habitats.

Nos ambientes dulcícolas serão obtidas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de quironomídeos, girinos de anfíbios e uma espécie de camarão de água doce. Nos ambientes estuarinos, também devem ser obtidas amostras de uma espécie de camarão. Quanto aos peixes dulcícolas, a Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio define a coleta de exemplares de

tucunaré (*Cichla* sp.), bagre (*Pimelodus maculatus*), curimatá (*Prochilodus* sp.) e cascudo (*Hypostomus affinis*). Em relação aos peixes estuarinos, devem ser coletados exemplares de carapicu (*Eucinostomus* sp.), corvina (*Pachyurus adspersus*), bicudo (*Pomadasys ramosus*) e bagre-caçari (*Genidens genidens*).

O fitoplâncton deve ser coletado por meio de redes de arrasto com malha de 60 µm e diâmetro de boca de 60 cm. As amostras de zooplâncton, larvas de quironomídeos e girinos de anfíbios serão obtidas por meio de arrastos com rede tipo WP-2 com malha de 200 µm e 60 cm de diâmetro de boca. Define-se que a coleta de crustáceos e peixes deve ser feita com petrechos diversos (redes de cerco, arrasto e espera, puçás, peneiras, covos e pesca elétrica), de acordo com o tipo de ambiente.

Para as análises das concentrações de metais nos organismos do rio Doce e região estuarina, serão coletados cinco *pools* de fitoplâncton, cinco de zooplâncton, cinco de larvas de quironomídeos, cinco de girinos de anfíbios (todos com aproximadamente 0,5 g em cada *pool*), 10 exemplares da espécie de camarão e seis exemplares de cada uma das espécies de peixes acima mencionados por ponto de monitoramento. Após a biometria, os crustáceos serão anestesiados e a hemolinfa de cada indivíduo coletada por punção hemolinfática. Os exemplares serão dissecados para a coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. Após a biometria, os peixes também serão anestesiados e o sangue de cada indivíduo coletado por punção venosa. Os exemplares de peixes também serão dissecados para a coleta de músculo, brânquias e fígado.

A hemolinfa dos crustáceos e o sangue dos peixes serão preparados em seguida para análises de biomarcadores de dano ao material genético. Todas as amostras coletadas para análises de concentrações de metais serão acondicionadas em frascos plásticos devidamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ, congeladas e transportadas para o laboratório, permanecendo congeladas em *freezer* comum. Nestas amostras serão analisadas as concentrações de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

Será coletada uma duplicata de todas as amostras destinadas à análise de concentração de metais para análises de biomarcadores. Os *pools* terão os mesmos 0,5 g cada e as espécies

de peixes e camarão, as mesmas quantidades de exemplares. No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas/fígado serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou *ultrafreezer* (-80°C), para análise posterior de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em animais dulcícolas e estuarinos (composição iônica corporal/hemolinfática/plasmática, atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

No caso das amostragens na foz do rio Doce e região costeira adjacente (cujos pontos de amostragem foram apresentados no Quadro 2), serão coletados, sempre que possível, fitoplâncton e zooplâncton (ambos com redes de coleta próprias), hidrocorais e corais (ambos por coleta manual por mergulho autônomo), poliquetos e moluscos (ambos por coleta manual após triagem de sedimento coletado com draga), macrocrustáceos (com rede de arrasto ou armadilha) e peixes (com redes de arrasto, emalhe ou outra arte de pesca). As espécies de macrocrustáceos devem incluir *Farfantepenaeus paulensis* e *F. brasiliensis* (camarões-rosa) e *Xiphopenaeus kroyeri* (camarão-sete-barbas), enquanto as espécies de peixes devem incluir *Conodon nobilis* (roncador), *Cynoscion* sp. (pescadinha), *Balistes capriscus* (peroá) e o chamado linguado-sem-mancha.

Para as análises da concentração de metais nas amostras da biota da foz do rio Doce e região costeira adjacente serão coletadas:

- a) fitoplâncton - cinco amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de *pools* de, no mínimo, três arrastos distintos com duração entre 10 e 15 min);
- b) zooplâncton - cinco amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de *pools* de, no mínimo, três arrastos distintos com duração entre 10 e 15 min);
- c) hidrocorais - 10 fragmentos de *Millepora alcicornis* por ponto de coleta;
- d) corais - 10 fragmentos de *Mussismilia harttii* por ponto de coleta;
- e) poliquetos - 10 indivíduos por ponto de coleta;
- f) moluscos - 10 indivíduos por ponto de coleta;
- g) macrocrustáceos - 10 indivíduos por ponto de coleta e por espécie;
- h) peixes - 10 indivíduos por ponto de coleta e por espécie.

O procedimento para as análises de metais segue o descrito para as amostras do rio Doce e região estuarina. Após a biometria, os crustáceos e peixes serão anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo de crustáceo e o sangue de cada peixe será coletada e o organismo dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas/fígado. A hemolinfa dos crustáceos e o sangue dos peixes serão preparados em seguida para análises de biomarcadores de dano ao material genético. Todas as amostras coletadas para análises de concentrações de metais serão acondicionadas em frascos plásticos devidamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ, congeladas e transportadas para o laboratório, permanecendo congeladas em *freezer* comum. Nestas amostras serão analisadas as concentrações de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

Também como descrito para as amostras do rio Doce e região estuarina, será coletada uma duplicata de todas as amostras destinadas à análise de concentração de metais para análises de biomarcadores. Será o mesmo número de amostras e composição de *pools* para o fitoplâncton e zooplâncton, o mesmo número de fragmentos de hidrocorais e corais e o mesmo número de indivíduos de poliquetos, moluscos, macrocrustáceos e peixes. No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas/fígado serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou *ultrafreezer* (-80°C), para análise posterior de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

Nos pontos de amostragens das praias (apresentados no Quadro 3) serão coletados exemplares de uma espécie de poliqueto, uma de anfípodo e do isópodo *Excirrolana* sp. (todos por meio da triagem manual do sedimento) e do caranguejo *Ocypode quadrata* (por coleta manual). Para as análises de concentrações de metais, serão obtidos, por ponto de amostragem, 10 indivíduos de poliqueto, 10 indivíduos de caranguejo, cinco *pools* da espécie de anfípodo e cinco de isópodo.

No caso dos crustáceos (anfípodo, isópodo e caranguejo), os procedimentos de biometria e obtenção das amostras (hemolinfa, músculo, brânquias e hepatopâncreas) seguem o descrito anteriormente para as análises de concentrações de metais e de biomarcadores de dano no material genético para crustáceos dos outros ambientes. Os metais a serem analisados também serão os mesmos.

O mesmo vale para a obtenção das duplicatas para análises de biomarcadores. Serão realizadas análises de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de biomarcadores de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

Nos manguezais serão coletados exemplares de *Cardisoma guanhumi* (guaiaumum) e *Ucides cordatus* (caranguejo-uçá) conforme pontos de coleta e procedimentos descritos no Anexo 5 do TR4. Para os manguezais de franja sobre lateritos da RVS de Santa Cruz, serão coletados exemplares de espécies de crustáceos decápodes (siris e caranguejos) predominantes nestes ambientes.

Para as análises de concentrações de metais na biota de manguezais, serão coletados 10 indivíduos de cada espécie mencionada no parágrafo acima em cada ponto de amostragem. Os procedimentos de biometria e obtenção das amostras (hemolinfa, músculo, brânquias e hepatopâncreas) seguem o descrito anteriormente para as análises de concentrações de metais e de biomarcadores de dano no material genético para crustáceos dos outros ambientes. Os metais a serem analisados também serão os mesmos.

O mesmo vale para a obtenção das duplicatas para análises de biomarcadores. Serão realizadas análises de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de biomarcadores de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

- Avaliação da microbiota no sedimento e na água da bacia do rio Doce e da região costeira

O Anexo 1 prevê monitoramento da microbiota total em água, sedimento e associada aos corais com a utilização de triplicatas das amostras em cada ponto de amostragem (sendo até 12 amostras por ponto apresentados nos Quadros 1 e 2). Será extraído o DNA total dessas amostras e posterior análise molecular por métodos de *fingerprinting* e de sequenciamento, utilizando-se sequenciadores de DNA de nova geração. O objetivo das análises das sequências é a avaliação do *core* microbiano, a identificação dos microrganismos ocorrentes em cada ponto e campanha, e a correlação estatística dos resultados de diversidade microbiana com as demais análises deste Programa de Monitoramento. Segundo o Anexo 1, isto permite indicar eventuais alterações temporais e/ou pontuais e identificar bioindicadores microbianos associados à presença de sedimentos e/ou de impactos nas diferentes áreas amostradas, que poderiam ser rastreados em áreas adjacentes.

- Coleta de amostras de aves

O monitoramento da bioacumulação de contaminantes em aves deve abranger espécies de diferentes hábitos alimentares para que se entenda o quadro de contaminação dos organismos e a biomagnificação dos contaminantes através da cadeia trófica. A periodicidade de amostragem das aves também será sazonal (inverno e verão). O Anexo 1 argumenta não ser possível prever que espécies poderão ser encontradas nas áreas de amostragem (entendendo-se aqui que as áreas de amostragem deste anexo seguem a revisão feita devido à coincidência com o escopo do monitoramento de fauna e flora integrado à Cláusula 168), em função da elevada heterogeneidade ambiental da área afetada do rio Doce. Assim, define coletas de exemplares de espécies representativas das guildas tróficas relacionadas aos ambientes dulcícola e estuarino, conforme o Quadro 4. Em cada um dos pontos de amostragem deverá ser coletada uma espécie de cada grupo alimentar, de acordo com o Quadro 4, conforme a sua abundância local.

Quadro 4 - Lista de priorização de espécies e guildas tróficas para coletas de amostras de aves.

Hábito alimentar/guilda trófica	Famílias	Exemplos de espécies para priorização
Invertebrados aquáticos, ovos e larvas de anfíbios, pequenos vertebrados e de origem vegetal.	Anseridae, Rallidae, Charadriidae, Scolopacidae	<i>Charadrius collaris</i> , <i>Actitis macularius</i> , <i>Aramides saracura</i> , <i>Gallinula galeata</i>
Filtradores, Plantas aquáticas, e invertebrados	Anatidae	<i>Dendrocygna autumnalis</i> , <i>Dendrocygna viduata</i> , <i>Amazonetta brasiliensis</i>
Peixes e invertebrados aquáticos	Podicipedidae, Ardeidae, Cerylidae	<i>Egretta caerulea</i> , <i>Egretta thula</i> , <i>Chloroceryle americana</i>
Piscívoras	Phalacrocoracidae, Sternidae, Rynchopidae, Alcedinidae	<i>Phaetusa simplex</i> , <i>Rynchops niger</i>
Malacófagos	Acciptridae*, Aramidae	* <i>Rostrhamus sociabilis</i>

Fonte: Anexo 1, TR4.

As espécies que terão exemplares capturados serão selecionadas com base na abundância em cada área de amostragem, devendo ser priorizadas as mais abundantes para evitar impactos populacionais e, ao mesmo tempo, permitir a obtenção de amostras das mesmas espécies ao longo de todo o período de monitoramento. As amostras devem ter, no mínimo, dois indivíduos da mesma espécie por área de amostragem e estação do ano (inverno e verão). Será priorizada a amostragem não-letal, seja por captura manual ou rede-de-neblina, ou coleta de indivíduos encontrados mortos.

As amostragens com redes-de-neblina nas diferentes áreas de amostragem serão realizadas com uma bateria de 10 redes de 12 m de comprimento cada dispostas em linha, mantidas em funcionamento por dois dias/noites consecutivos ou alternados. As redes visam capturar 10 exemplares por local por estação do ano (inverno e verão). Caso representantes de alguma guilda trófica não sejam capturados durante aquela campanha, deverá ser apresentada justificativa baseada em bibliografia especializada e/ou dados de abundância.

Os espécimes capturados terão coletadas amostras de sangue (máximo de 1% da massa corporal em microtubo ou frasco de 1,5 ml, sem anticoagulante) e penas de contorno (de cinco

a 10 penas). Para as aves encontradas mortas, o sangue deve ser obtido nos coágulos cardíacos. Amostras de sangue serão resfriadas em campo e congeladas assim que possível. As penas serão armazenadas a seco em sacos plásticos vedados (*zip-loc*).

Dois indivíduos de duas espécies de cada guilda trófica deverão ser capturados e eutanasiados para amostragem de sangue coagulado, músculo peitoral, fígado, penas de contorno e osso (fêmur). Este número de indivíduos e espécies será seguido em cada área de amostragem. Para obtenção e interpretação de dados quantitativos de contaminação, o conteúdo estomacal terá seus itens analisados (identificação taxonômica dos itens alimentares e quantificação da frequência de ocorrência absoluta e relativa; FO e FO%, respectivamente), contribuição numérica absoluta e relativa (N e N%, respectivamente) e contribuição em massa medida com balança de precisão ou reconstituída, absoluta e relativa (M e M%, respectivamente). Os parâmetros para análise de conteúdo estomacal devem seguir Faria *et al.* (2016).

A interpretação dos dados de bioacumulação de contaminantes ao longo da cadeia alimentar exige a análise simultânea de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) nos tecidos dos mesmos indivíduos amostrados. Para tanto, uma alíquota de 5-6 gotas de sangue e de 5-6 penas em crescimento (ainda com bulbo contendo sangue) de 10 indivíduos serão analisadas quanto aos isótopos estáveis. Para comparação com os valores isotópicos das aves, deverão ser obtidas amostras de tecido de pelo menos três itens alimentares de cada espécie de ave, selecionadas pela análise do conteúdo estomacal e/ou por observações de forrageamento em campo e literatura especializada. A preparação e análise das amostras de aves e de suas presas (sejam elas observadas nos estômagos ou selecionadas por observação/literatura) seguirão Faria *et al.* (2016). Os dados isotópicos serão analisados através de modelos bayesianos de misturas isotópicas, também seguindo Faria *et al.* (2016).

Dessa forma, poderiam ser eutanasiadas até 20 aves em cada uma das áreas de amostragem, sendo obtidos cinco tecidos de cada indivíduo (sangue, penas e três itens alimentares). Porém, deve ser priorizada a amostragem não-letal com coletas de penas e sangue. Assim, um número maior de indivíduos poderá ser amostrado, independentemente do método de coleta.

- Coleta e análise das concentrações de contaminantes em amostras de quelônios e cetáceos

Amostras de quelônios e cetáceos para análises de contaminantes devem ser obtidas por meio de animais encontrados encalhados no litoral norte capixaba. Quando acionadas sobre algum evento deste tipo, a equipe técnica deverá obter as seguintes informações locais: condição climática e de maré, coordenadas, identificação da espécie, existência de marcas de petrechos de pesca, registro fotográfico e biometria. O monitoramento das praias será realizado em parceria com o Programa de Monitoramento de Praias (PMP), em desenvolvimento pela PETROBRAS, por meio de parceria a ser firmada entre a empresa e a Fundação Renova. O monitoramento de quelônios (Anexo 6), já contratado pela Fundação Renova junto à Fundação Pró-Tamar, também poderá auxiliar na notificação de animais encalhados.

Quando acionada, a equipe do PMP irá até o local para avaliar a situação. Em caso de animal encontrado vivo, um médico-veterinário realiza os primeiros-socorros e orienta o procedimento de devolução do animal ao mar. Em caso de animal morto com até 3,0 m de comprimento, a carcaça deve ser transportada para a base instituições próximas que desenvolvam pesquisas relacionadas (preferencialmente em andamento). Para animais maiores que 3,0 m, o exame da carcaça e coleta de material devem ser realizados no local do encalhe.

Para o resgate e necrópsia de cetáceos, a equipe deve seguir o Protocolo de Conduta para Encalhes de Mamíferos Aquáticos da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE, 2005). Os animais receberão um número de registro para identificar as amostras biológicas obtidas.

Conforme o estado da carcaça, deve ser realizada a biometria e a necrópsia, para se identificar a causa da morte. Durante as necrópsias, serão obtidos a classificação taxonômica, comprimento total, peso, medidas alométricas, sexo, estágio de maturação, estado da carcaça, marcas de petrechos de pesca e amostras de tecidos para análises de DNA. A carcaça será fotografada, descarnada e os ossos coletados e acondicionados para maceração.

Todos estes dados serão registrados em fichas padronizadas, armazenados em um banco de dados e posteriormente interpretados. O material osteológico deve ser examinado para se buscar evidências de alterações patológicas. A limpeza do material osteológico será realizada por meio da técnica de maceração para posterior tombamento em coleções de referência (preferencialmente locais).

O estado de decomposição das carcaças pode limitar os tipos de amostras e de análises que podem ser obtidas. Portanto, as carcaças deverão ser classificadas conforme Geraci & Lounsbury (2005) por meio de uma gradação em códigos de 1 a 5, sendo 1 o animal vivo e 5 os restos de esqueleto ou carcaça mumificada.

As amostras de tecidos de quelônios e cetáceos passarão por análises de microcontaminantes e metais. Para mercúrio total (HgT), amostras frescas de 0,4 g de músculo, 0,2 g de fígado e 0,2 g de rim deverão ser tratadas a frio com 1 mL de H_2O_2 . Depois, são adicionados 5 mL de solução sulfonítrica concentrada ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$; v/v) e as amostras aquecidas em banho-maria a 60°C por 2 h até sua completa solubilização. Os extratos são então resfriados por 15 minutos e 10 mL de KMnO_4 (5%) adicionados aos extratos. As amostras então retornam ao banho-maria pela mesma temperatura e tempo (60°C por 15 minutos) e são depois resfriadas em repouso por uma noite. No dia seguinte, o extrato é reduzido pela adição de 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (HONH_2) a 12%. Ao extrato final acrescenta-se água Milli-Q até completar 14 mL. As leituras serão realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio. A certificação do método de determinação do HgT é feita por materiais certificados DOLT-5 (fígado de peixe) e DORM-4 (músculo de peixe) do *National Research Council - Canadá* (NRCC). Todas as amostras deverão ser analisadas em duplicata e usados brancos analíticos em todas as baterias.

O Anexo 1 define que a determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cr, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) deve ser realizada através de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), por meio de um espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Para tal, uma solução de nitrato de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) é utilizada como modificador químico por adição a cada solução a ser analisada. Esta solução é preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS

(Merck N° B9366989 710). O controle de qualidade é efetuado através do uso de materiais certificados de referência (DOLT-5 e DORM-4) do NRCC.

O Anexo 1 define que, para compostos organoclorados, as extrações são realizadas com aparelhos de *soxhlet* com capacidade para 60 mL e balões volumétricos de 125 mL, aquecidos individualmente por mantas. Será utilizada mistura de hexano e diclorometano (1:1; v/v) e utilizados 8 g de músculo (peso seco). Os padrões internos de PCB 103 e PCB 198 serão adicionados às amostras e volume final reduzido, para então se proceder à purificação com a adição de H₂SO₄ (conforme SANTOS-NETO *et al.*, 2014). O conteúdo lipídico das amostras será quantificado por gravimetria e as concentrações finais dos compostos organoclorados normalizadas a partir do conteúdo de lipídios na amostra. As concentrações dos pesticidas e das bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa, com detector de captura de elétrons (GC/ECD). O hidrogênio é utilizado como gás de arraste e o nitrogênio, como gás auxiliar (*make up*). O controle de qualidade é feito por meio de análises regulares dos brancos de procedimentos e de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

A determinação de compostos organobromados dependem de extrações idênticas às realizadas para os organoclorados, usando a mesma mistura e peso seco de músculo. Os padrões internos PBDE-181 e PBDE-209 serão adicionados às amostras e o volume final reduzido para se proceder à purificação conforme Covaci *et al.* (2003) e Voorspoels *et al.* (2003). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria e as concentrações finais dos organobromados normalizadas considerando-se o conteúdo de lipídios na amostra. As concentrações dos PBDEs e MeO-PBDEs são mensuradas por cromatógrafo de fase gasosa (GC) acoplado a espectrômetro de massa (MS). O GC irá operar no modo de ionização química negativa (ECNI). O metano será utilizado como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadrupólo e interface ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS será utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons $m/z = 79$ e 81 (de tri- a hepta-BDEs) e $484,7/486,7$ e $494,7/496,7$ (para BDE 209 e ¹³C-BDE 209, respectivamente), monitorados durante toda a corrida. O controle de qualidade é realizado por meio de análises regulares dos brancos de procedimentos e injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

O Anexo 1 também define a análise de HPAs, que será adaptada e otimizada a partir do descrito pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA, 2014). Alíquotas das amostras liofilizadas são pesadas e extraídas em *soxhlet* com metanol depois saponificadas por adição de hidróxido de potássio. A amostra é transferida para um funil de separação e adicionado hexano. Através de agitação manual, o extrato de hexano é separado e recolhido em novo balão. O procedimento é repetido três vezes, sendo todo o extrato de hexano recolhido e reduzido a cerca de 1 mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos são purificados por *clean up* em colunas de vidro. Ao extrato reduzido em Turbo vap é adicionado o padrão interno, para quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs é realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS).

- Amostras de sedimento

Amostras de sedimento serão obtidas nos pontos do estuário (Quadro 1), da foz e região costeira adjacente (Quadro 2) e nas praias (Quadro 3). Estas amostras serão coletadas com auxílio de pá ou draga do tipo Van Veen, a depender do local. Em cada ponto de amostragem serão coletadas quatro amostras de sedimento, que deverão ser abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na sua superfície. As amostras serão fotografadas imediatamente após a coleta para registro de suas características visuais. Para a análise de metais, deve-se usar uma espátula de plástico para raspar os primeiros centímetros da amostra, obtendo-se assim apenas os cinco primeiros centímetros superficiais. Para cada amostra, necessita-se de aproximadamente 10 g de sedimentos, os quais serão armazenados em pote plástico e mantidos congelados. Em todas as amostras serão analisadas as concentrações de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

- Análises de parâmetros físico-químicos da água e modelagem ecotoxicológica

Amostras de água, medidas da temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido serão coletadas com uma sonda multiparâmetros no momento da coleta. A concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) será determinada em amostras de água filtradas em malha de 0,45

µm, por meio de um analisador de carbono total (TOC). A concentração de sulfatos será determinada por método turbidimétrico com leitura em espectrofotômetro a 420 nm (TABATABAI, 1974). A alcalinidade total é mensurada por titulação com solução padrão ácida, utilizando-se método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (Ca, K, Mg e Na) é determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. A concentração de cloretos é analisada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Com base nos resultados obtidos para as amostras de água doce, será realizada a modelagem ecotoxicológica dos dados com fins à previsão da biodisponibilidade e toxicidade de metais nos diferentes ambientes dulcícolas, por meio do Modelo do Ligante Biótico (BLM) versão 2.2.3.

- Análises das concentrações de metais nas amostras de água, sedimento, invertebrados, peixes e aves

As análises das concentrações dos metais As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de água (estuarina e marinha), sedimento, invertebrados (indivíduos inteiros ou tecidos), peixes (tecidos) e aves (tecidos) serão feitas em forno de grafite acoplado a espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. A análise da concentração de Hg será realizada pelo método de vapor frio, com gerador de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica. As análises das concentrações de metais em todas as amostras de água, sedimentos e material biológico deverão ser realizadas em triplicata.

Para as análises de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn, as amostras de água filtradas e não filtradas oriundas dos pontos de amostragem da foz do rio Doce e região costeira adjacente serão dessalinizadas para minimizar um possível "efeito matriz" associado às altas concentrações de íons típicas da água salgada (NADELLA *et al.*, 2009). Isso é feito pela precipitação dos metais representativos presentes em 1 mL de amostra de água após adição de 1 µL de óxido de lantânio (10 mg La/mL) e 7,5 µL de carbonato de sódio (1 M), aumentando o pH para 9,8. A solução é depois gentilmente agitada em banho-maria a 80°C por 30 minutos flocular o precipitado, majoritariamente formado por hidróxido de lantânio. A solução resultante é centrifugada a 3.000 xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante obtido descartado. O precipitado remanescente é dissolvido em 1 mL de Suprapur® e utilizado na determinação da concentração de metais.

As concentrações totais e dissolvidas dos metais nas amostras de água serão apresentadas em $\mu\text{g/L}$ e comparadas com a Resolução CONAMA 357/2005, observando-se se é água doce, salobra ou marinha e as classes de qualidade de cada amostra de água em análise. A acurácia e exatidão das análises serão aferidos por controles de qualidade analíticos: “brancos”, onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras são igualmente realizados, mas na ausência da amostra. Ademais, serão utilizadas soluções padrões certificadas do NRCC (NASS-6: água marinha; SLEW-3: água salobra; SLRS 6: água doce).

As amostras de material biológico são previamente secas em estufa ($45\text{-}60^\circ\text{C}$) até peso seco constante e depois digeridas em Suprapur® na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. Será obtido o teor de água de cada amostra. As amostras são submetidas à digestão ácida lenta em *Eppendorfs* devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora ($45\text{-}60^\circ\text{C}$) até a digestão completa. Ao material biológico digerido será acrescentada água tipo Milli-Q até completar 1 mL. Caso necessário, as amostras serão diluídas com água tipo Milli-Q para adequar as concentrações dos metais nas amostras àquelas presentes nas soluções padrões certificadas para calibração do equipamento.

As concentrações dos metais no material biológico serão apresentadas em $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e $\mu\text{g/g}$ de peso seco (mg/kg de peso seco). Os resultados das amostras de músculo de crustáceos e peixes serão comparados com os limites da Resolução RDC ANVISA Nº 42/2013. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, deverão ser realizados controles de qualidade analíticos. Além do uso de “brancos” para aferir a acurácia e exatidão das análises, serão utilizados materiais de referência certificados para análise de metais-traços (DOLT-5: fígado de peixe; DORM-4: músculo de peixe; TORT-3: hepatopâncreas de lagosta). Amostras destes materiais serão tratadas e analisadas igualmente às amostras do material biológico deste monitoramento, conforme descrito anteriormente.

As amostras de sedimento serão tratadas com digestão ácida, conforme EPA (1996). As concentrações de metais serão apresentadas em $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e $\mu\text{g/g}$ de peso seco (mg/kg de peso seco). Além do uso de “brancos” para aferir a acurácia e exatidão das análises, será utilizado material de referência do NRCC (MESS-4). Amostras de

sedimento serão tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras coletadas neste monitoramento, conforme descrito anteriormente.

Para todas estas análises, serão apresentados os percentuais de recuperação dos metais encontrados nas soluções padrão certificadas e os limites de detecção e quantificação do método para os metais analisados.

- Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes

Concentração de metalotioneínas

A concentração de metalotioneínas será determinada segundo Viarengo *et al.* (1997). O material biológico é homogeneizado e centrifugado a 6.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o precipitado homogeneizado com 1 mL de etanol a 87% e clorofórmio a 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM). A solução resultante é centrifugada a 6.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante é novamente descartado e o novo precipitado homogeneizado em 150 µL de NaCl (250 mM). Posteriormente são adicionados 150 µL de solução de EDTA (4 mM) e HCl (1 N). A seguir, 100 µL de cada amostra (em duplicata) deverão ser adicionadas a 1,4 mL de solução de DTNB preparada em um tampão (pH 8,0) contendo Na₂HPO₄·7H₂O (200 mM), NaCl (2 M) e DTNB (0,43 mM). Após nova centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos, 350 µL do sobrenadante de cada amostra é transferido, em duplicata, para as poças de uma microplaca. A leitura de absorbância é feita em espectrofotômetro de microplacas a 405 nm. Os resultados serão apresentados em µmol GSH/g de peso úmido de tecido.

Composição iônica corporal, hemolinfática ou plasmática

Para determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados coletados são lavados em água tipo MilliQ por 30 s, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa a 70°C, é determinado o peso seco do material e este digerido em Suprapur®. As amostras são diluídas para análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama, após digestão completa. A

concentração de cloretos será determinada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre, sendo os resultados apresentados em mg/g de peso úmido.

A composição iônica hemolinfática e plasmática será analisada nas amostras de hemolinfa (crustáceos) e sangue (peixes), respectivamente, conforme descrito para a análise da composição iônica corporal.

Atividade da $Na^+,K^+-ATPase$

Para a determinação da atividade da $Na^+,K^+-ATPase$, as amostras biológicas serão preparadas conforme Péqueux & Chapelle (1982). As amostras são homogeneizadas em meio com 1 mL de tampão SI (Sacarose - Imidazol em pH 7,6) e mantidas em banho de gelo. Depois serão centrifugadas a 5.000 rpm e a 5°C por 5 minutos. São recolhidos 100 µL do sobrenadante e adicionados 2,5 mL de uma solução salina A com 77 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 6 mM de $MgCl_2$ e 3 mM de ATP. O pH da solução é ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras são incubadas no escuro por 60 minutos a 25°C e feita a leitura a 620 nm. A mesma reação é feita com 100 µL de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina B com 83 mM de NaCl, 6 mM de $MgCl_2$, 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína.

As duas reações são mantidas por 1 h e depois inibidas pela adição de ácido tricloroacético a 50%. A quantidade de fósforo produzido em cada reação é determinada por um kit de reagentes específicos. A diferença na quantidade de fósforo entre as duas reações é considerada como aquela atribuída à atividade da $Na^+,K^+-ATPase$. A concentração da proteína no homogeneizado é determinada por método colorimétrico segundo o método de Bradford, onde a albumina de soro bovino é usada como padrão. A atividade da enzima será apresentada em µmoles Pi/mg proteína/h.

Atividade de enzimas envolvidas na calcificação

A preparação das amostras para análise dos parâmetros de calcificação é feita por maceração em nitrogênio líquido e segregação em alíquotas de 150 a 200 mg. As amostras são homogeneizadas em tampão específico (1:1; peso/volume) para cada ensaio com o auxílio de

um sonificador e centrifugadas a 10.000 xg e 4°C por 20 minutos. O sobrenadante é imediatamente utilizado para as medidas de atividade enzimática (Ca_2^{+} -ATPase, Mg_2^{+} -ATPase e anidrase carbônica). A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas é realizada segundo o método de Bradford.

A determinação da atividade da anidrase carbônica é realizada pela mensuração da redução de pH associada à catálise da hidratação do CO_2 com a consequente liberação de H^{+} (HENRY, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras é composto por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritiotreitol (DTT 1 mM). Quinze μL do homogeneizado são adicionados a 3 mL de uma solução de reação feita de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). São adicionados 280 μL de substrato (água destilada saturada com CO_2) e o pH registrado a cada 5 s durante 30 s por um pHmetro de bancada. Ao mesmo tempo são feitas determinações do “branco de reação”, quando 15 μL do tampão de homogeneização são acrescentados à solução de reação e ao substrato. Será utilizado o modelo de regressão linear, sendo o pH a variável dependente e o tempo a variável independente, para definir a declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos a partir dos homogeneizados é a taxa de reação catalisada, enquanto a média dos dados obtidos nos brancos é a taxa da reação não catalisada. Os resultados são normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e apresentados em unidades de anidrase carbônica/mg de proteína.

A determinação das atividades da Ca_2^{+} -ATPase e da Mg_2^{+} -ATPase seguirá Vajreswari *et al.* (1983) com adaptações. O homogeneizado da amostra é preparado com tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado é centrifugado a 10.000 xg a 4°C por 20 minutos, sendo 20 μL do sobrenadante usados na análise. O meio de reação para análise da atividade da Ca_2^{+} -ATPase é formado por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), CaCl_2 (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação é feita a 30°C por 30 minutos.

O meio de reação para análise da atividade da Mg_2^{+} -ATPase é formado por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), EGTA (0.2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação desta reação também é feita a 30°C por 30 minutos. ATP (3 mM) e ouabaína (1mM) são adicionados aos

meios de reação no início da incubação. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação é determinada pelo método colorimétrico (630 nm). Os resultados são normalizados com base na quantidade de proteínas totais presente nos homogeneizados e apresentados em mM Pi/mg proteína/min.

Atividades de enzimas do metabolismo energético

As atividades da lactato-desidrogenase (LDH) e malato-desidrogenase (MDH) serão determinadas em homogeneizados das amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados neste monitoramento. Estes homogeneizados são obtidos por maceração mecânica em mistura contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton x 100 e obtido o sobrenadante. Para LDH, a avaliação da atividade é feita pela mistura de solução de piruvato de sódio (1 mM), KCl (100 mM), tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e NADH (250 μ M) a uma alíquota do sobrenadante de homogeneizado de brânquia e outra de fígado. Para MDH, são adicionados às alíquotas dos sobrenadantes uma solução de ácido oxalacético (0,4 mM), MgCl₂ (20 mM), NADH (150 μ M) e tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas seguem Thuensen *et al.* (2005) e Childress & Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, adaptadas por Ribeiro *et al.* (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas em análise é determinada por espectrofotometria UV em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados devem seguir o método de Bradford. As atividades enzimáticas serão apresentadas em U/mg de proteína.

Atividades de enzimas antioxidantes

As atividades da catalase e da superóxido-dismutase são analisadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito para LDH e MDH. A atividade da catalase é determinada pela análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio, conforme Beutler (1975). A atividade da superóxido-dismutase é analisada pela mensuração do grau de redução do citocromo C, conforme McCord & Fridovich (1969). A dosagem de proteínas dos homogeneizados deve seguir o método de Bradford. A atividade da catalase será apresentada em μ mol H₂O₂/mg proteína/min, enquanto a atividade da superóxido-dismutase é apresentada em U/mg de proteína.

Peroxidação lipídica (LPO)

A LPO é aferida nas amostras de material biológico pelo método fluorescente baseado nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Oakes & van Der Kraak (2003). Este método quantifica os danos em lipídios por meio da reação do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o TBARS, que ocorre em condições de acidez e alta temperatura (95°C), gerando um cromógeno fluorescente. As amostras são homogeneizadas (1:9; peso:volume) utilizando-se solução tampão. A fluorescência gerada (emissão: 520 nm; excitação: 580 nm) é medida por um espectrofluorímetro. Os dados são calculados com base em uma curva construída com soluções padrões de tetrametoxipropano (TMP), que gera MDA após hidrólise. Os resultados são normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, determinado pelo método de Bradford. Os dados serão apresentados em nmol MDA/mg proteína.

Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas serão analisados segundo Dalle-Donne (2003), ou seja, serão utilizadas as técnicas de eletroforese unidimensional e ensaio imunológico por *Western blotting* para mensurar a concentração de proteínas carboniladas nas amostras biológicas. A detecção das proteínas carboniladas envolve a derivatização do grupamento carbonil com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), levando à formação de um produto estável, a 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP). Antes da derivatização, o conteúdo de proteínas da amostra é padronizado em 0,2 mg/ml de homogeneizado, com o objetivo de normalizar as amostras antes do ensaio de eletroforese (SDS-PAGE) e *Western blotting*. No processo de derivatização, as proteínas reagem com DNPH em solução com 12% SDS e em solução de DNPH/TFA [20 mM DNPH em 20% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA)]. Adicionalmente, três amostras servirão como controle positivo, contendo 1, 2 e 4 mM de peróxido de hidrogênio para induzir o dano oxidativo na amostra. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, a mistura de reação é neutralizada com solução 2M de Tris-Base com 30% de gliceraldeído. Para cada amostra, as proteínas derivatizadas com DNPH são separadas para eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12% (1D SDS-PAGE), eletroprecipitadas em membranas de PVDF e

submetidas ao ensaio imunológico para determinação do conteúdo de proteínas carboniladas com um anticorpo anti-DNP (Invitrogen®). As bandas obtidas são visualizadas com um kit de reagentes para imunodeteção colorimétrica (Invitrogen®). A densidade das bandas obtidas é analisada para cada amostra após escaneamento da membrana de PVDF. Os resultados são apresentados em *pixels* de densidade ótica.

Dano de DNA

O DNA genômico de cada amostra é isolado com um kit de reagentes específico (PromoKine, Promocell®). A análise de danos oxidativos no DNA é feita com base na identificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP). Os sítios AP são medidos com uma sonda que reage com o grupo aldeído destes sítios, detectados por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para isso é utilizado um kit de reagentes de detecção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (PromoKine, Promocell®). Os resultados são apresentados em sítios AP/mg de proteína, considerando a concentração de proteínas nas amostras, determinada pelo método de Bradford.

O dano ao material genético também será avaliado por testes dos ensaios do vermelho neutro, micronúcleos e cometa com amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes.

O ensaio do vermelho neutro é feito com os hemócitos das amostras de hemolinfa de camarões e caranguejos das diferentes áreas do monitoramento. As lâminas para microscopia (76 x 26 mm) são lavadas antes da coleta (primeira lavagem com água e detergente neutro a 5%; segunda lavagem com água corrente; terceira lavagem com solução de água destilada saturada com HCl; quarta lavagem com água destilada em abundância). As lâminas são depois secas e uma de suas faces tratadas com solução de poly-L-lisina em água destilada (1:10) para a adesão dos hemócitos vivos na superfície. Isto é feito pingando-se 10 µL dessa solução com uma micropipeta monocal sobre uma das laterais da lâmina, fazendo esfregaço com lâmina e posterior disposição ao ar para secagem. A diluição da hemolinfa dos crustáceos é feita com solução fisiológica específica para a espécie-alvo. A solução estoque de vermelho neutro consiste da dissolução de 0,0228 g deste corante em 1 mL de DMSO (dimetil-sulfóxido), com posterior preparo da solução de trabalho de vermelho neutro (10 µL da solução estoque +

5 mL de solução fisiológica) homogeneizada com agitador magnético por 1 a 2 minutos. Também deverá ser preparada uma solução anticoagulante, formada por 2,05 g glicose, 0,8 g de citrato de sódio e 0,42 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada, diluída com solução fisiológica na proporção 2:1 (0,334 mL de solução anticoagulante e 0,166 mL da solução fisiológica). Aspira-se 0,7 mL desta solução anticoagulante com uma seringa hipodérmica (1 mL) e agulha 21 gauge (que impede a destruição dos hemócitos e a formação de coágulos). À solução são adicionados 0,3 mL de hemolinfa do crustáceo, colhida na membrana de articulação carpo-propodal do quelípodo maior. O conteúdo é transferido para tubo siliconado (2 mL) e mantido em descanso por 15 minutos para minimizar a força de adesão, evitando o rompimento dos hemócitos e a coagulação. Quarenta μ L dessa solução (hemolinfa, solução fisiológica e solução anticoagulante) são retirados com micropipeta e colocados ao centro da lâmina de microscopia previamente tratada, sendo então mantidas em câmara úmida escura por 15 minutos.

Quarenta μ L da solução de trabalho de vermelho neutro são pipetados sobre cada lâmina, homogeneizado aos 40 μ L de hemolinfa previamente pipetados e cobertos por lamínula. As lâminas são mantidas em câmara úmida escura por mais 15 minutos para penetração do corante nos hemócitos. Na primeira hora, as lâminas são examinadas em microscópio óptico a cada 15 minutos e a cada 30 minutos na segunda hora, se preciso. Deve ser utilizado o menor aumento, de 50x, com elevação gradual para 400 ou 500x, caso necessário. Quando da observação, a luz incidente deve ser reduzida porque o corante é foto-lábil. As células serão cuidadosamente examinadas e anotadas as anormalidades estruturais e o tempo de retenção do vermelho neutro. Para esta última observação, é estimada a proporção de células com perda lisossomal para o citosol e as anormalidades de tamanho e/ou cor dos lisossomos. Para a avaliação temporal das lâminas, o sinal “+” indica que <50% das células apresentam citosol claro e ausência de anormalidades estruturais ou estresse, o sinal “ \pm ” indica 50 a 75%, e o sinal “-” indica >75%.

A avaliação do dano no material genético também pode ser feita por ensaio de micronúcleo, sendo utilizadas amostras de hemolinfa e sangue. Após coleta das amostras com seringas (1 mL e agulhas 21 gauge), estas são transferidas para tubos siliconados. Os tubos são microcentrifugados a 1.000 rpm por 5 minutos e retirados 50 μ L com micropipeta colocada

junto ao fundo do tubo. Este material é gotejado na lateral da lâmina e espalhado por esfregação com outra lâmina. O procedimento é realizado até a obtenção de três lâminas/indivíduo, sendo as lâminas secas ao ar, fixadas com solução de Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) por cerca de 20 minutos e novamente secas ao ar. As lâminas são então coradas com solução de Giemsa a 2%, preparada em tampão fosfato com pH 8,0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$), também por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas são lavadas com água deionizada, secas ao ar e com adesão de lamínulas com Entellan®.

As lâminas são examinadas sob microscópio óptico comum integrado a um sistema de análise de imagens por computador, com contagem das células micronucleadas pelo programa KS300®. As três lâminas de cada indivíduo são avaliadas em aumento de 1.000x, com avaliação de 1.000 hemócitos em cada lâmina, sendo então quantificado o número de células micronucleadas por 1.000 células analisadas (MN%).

O ensaio “cometa” é outra forma de avaliação de dano ao material genético, sendo utilizadas as mesmas amostras de hemolinfa e sangue. Alíquotas das amostras são misturadas a 100 μL (0,5%) de agarose com baixo ponto de fusão, diluídas em tampão fosfato (342 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 e 1,7 mM K_2HPO_4) e 16 mM KCl (pH 7,6; 780 mOsmol/kg), e colocadas sobre lâminas já preenchidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobertas por lamínulas e mantidas sob refrigeração por 5 a 7 minutos até se solidificarem. As lamínulas são então colocadas em solução de lise gelada com pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO e 1% TRITON X-100) por, no mínimo, 1 h, lavadas e mergulhadas em uma cuba com tampão alcalino de eletroforese com pH >13 (10 M NaOH, 200 mM EDTA) por 15 minutos para desnaturação do DNA. A eletroforese é feita sob 1V/cm e 300mA durante 15 minutos, em gelo. Depois, as lâminas são lavadas em tampão de neutralização com pH 7 (0,4 M Tris) por mais 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos.

São examinadas 100 células/lâmina, sendo duas lâminas/indivíduo. Os “cometas” são classificados em relação à extensão da migração do DNA (variável qualitativa), sendo: (0) sem dano; (1) ligeiramente danificado; (2) moderadamente danificado; (3) muito danificado; e (4) dano máximo. É também medida a “cauda” desses “cometas” (variável quantitativa), por meio do *software* KS-300®, em um sistema de análise de imagens por computador acoplado a um

microscópio Axiolab®. A eletroforese deverá permitir avaliar os danos ao DNA causados por processos biológicos, como quebras de cadeia simples de DNA, lesões a sítios álcali-lábeis ou, ainda, reparo incompleto dos sítios de excisão. A variável qualitativa representa a proporção de extensão dos danos ao DNA nas quatro classes em análise, podendo ser confrontadas por uma análise de proporções multinomiais.

A técnica imuno-histoquímica de indução de apoptose é a quarta técnica de avaliação de danos ao material genético, feita com amostras de brânquias e fígado de peixes. Cortes histológicos de brânquias e fígado são reidratados e tratados com tripsina (1mg/mL em PBS 0,01 mol/L, pH 7,4) por 3 minutos a 37°C e incubados com soro *goat* a 5% por 30 minutos, para evitar ligações não-específicas. Os cortes são depois incubados durante 16 h em câmara úmida com o anticorpo primário (anti-caspase) diluído em PBS-A 0,005% (tampão fosfato salino, 0,01mol/L, pH 7,4) a 4°C. Os cortes são novamente incubados com o anticorpo secundário biotinilado (Vector Laboratories ®) por 1 h para posterior amplificação com kit Vectastain ABC Elite (Vector Laboratories ®) em temperatura ambiente, por 30 minutos. A DAB (3,3'-diaminobenzidina, 1:300) é o substrato usado para a peroxidase. Os cortes são lavados cinco vezes em PBS 0,01 mol/L entre todos os passos descritos acima, exceto antes da incubação com anticorpo primário. Padronizações quanto à recuperação antigênica, concentração de anticorpos e outros são realizados caso a caso.

Danos morfológicos

Efeitos histopatológicos serão avaliados em brânquias e fígado de peixes. Além destes, serão coletadas gônadas para estudo de ecotoxicologia reprodutiva, histopatologias gonadais, análise quantitativa de atresia folicular e outras patologias gonadais. As amostras de tecidos serão pesadas no momento da coleta e, baseando-se no peso corporal e dos órgãos coletados, será obtido o peso relativo (PR) de cada um deles pela fórmula:

$$PR = MP/MC \times 100$$

onde:

MC = massa corporal;

MP = massa total do órgão.

Fragmentos dos tecidos serão imersos em paraformaldeído a 4% por 24 h, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast. O material será seccionado em micrótomo rotativo e as secções obtidas coradas com hematoxilina/eosina e tricômio de Mallory. Algumas lâminas serão submetidas à técnica de coloração PAS, cuja preparação inclui banho em ácido periódico a 1% por 10 minutos, lavagem em água destilada e imersão em Reativo de Schiff por 20 minutos. Em seguida, as lâminas são novamente lavadas em água corrente por 10 minutos, coradas com hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavadas em água destilada, desidratadas e montadas. O material é utilizado para análises histopatológicas, sendo avaliadas áreas de necrose, esteatose, gotículas lipídicas, colestase, neoplasias, melanomacrófagos, alterações nucleares, congestão hemorrágica, infiltrados inflamatórios, fibrose e aneurisma lamelar.

Biomarcadores de desregulação endócrina

Serão realizadas as análises de biomarcadores de desregulação endócrina vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrp) em amostras de fígado e/ou plasma sanguíneo, notadamente em machos. Pode ser determinada a razão sexual e a proporção de peixes intersexo nas amostras.

4.3 Anexo 2 - Estudo e monitoramento do ambiente dulcícola da Área Ambiental I

Este item irá tratar apenas dos aspectos que não foram contemplados no Plano de Trabalho já entregue para atendimento da alínea “a” da Cláusula 164 e Notificação IBAMA nº 678311-E. Este monitoramento está em andamento, tendo sido iniciado em abril de 2017 pela empresa Econservation, contratada pela Fundação Renova para condução das atividades. Recentemente, a Fundação Renova informou ao CIF sobre o início das ações deste monitoramento por meio do Ofício SEQ1965-02/2017/GJU, de 21/09/2017.

Para a flora aquática serão tratados a seguir apenas dos estudos referentes às macrófitas aquáticas, pois os demais também já estão sendo tratado no âmbito do Plano de Trabalho já entregue para atendimento da alínea “a” da Cláusula 164.

Ressalta-se, por último, que as atividades aqui previstas serão desenvolvidas apenas nos pontos de amostragem localizados no Espírito Santo, conforme entendimento resultante da análise das Deliberações nº 112 e 113 do CIF. As amostragens de ambientes dulcícolas em Minas Gerais seguirão as determinações da Nota Técnica DFAU/IEF/SISEMA nº 007/2017.

4.3.1 Objetivos

O Anexo 2 não apresenta objetivos. No entanto, podem ser elencados objetivos referentes ao conhecimento da fauna e flora aquática do rio Doce, incluindo parâmetros relacionados à estrutura e dinâmica de populações, genética de populações, macrófitas aquáticas e integridade dos ambientes.

4.3.2 Área de Estudo

Para atendimento à Deliberação nº 112 do CIF, restringe-se à atuação deste anexo aos 10 pontos de amostragem rio Doce e seus afluentes localizados no Espírito Santo, conforme Quadro 5.

Quadro 5 - Pontos de amostragem do Anexo 2 - TR4 na porção capixaba do rio Doce e região estuarina.

Ponto	Local	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
17	Rio Guandu	288351,08	7828746,17
18	Lagoa do Limão	355688,84	7837447,02
19	Lagoa Nova	377287,60	7855827,03
20	Lagoa Japarana	385766,88	7859664,14
21	Rio Doce	387144,67	7853249,98
22	Rio Doce	410025,62	7837309,00
23	Lagoa do Areão	411472,58	7835831,65
24	Lagoa do Areal	413154,34	7834176,33

Ponto	Local	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
25	Lagoa Monsaraz	415912,93	7837161,08
26	Foz do rio Doce	414079,86	7828234,12

Fonte: Anexo 2, TR4.

4.3.3 Metodologias e Periodicidade

Este projeto irá amostrar mensalmente a ictiofauna no primeiro e quinto anos de execução e trimestralmente nos outros três anos. Conforme o TR4, o primeiro ano de atividades do Anexo 2 segue as metodologias, premissas e periodicidade definidas no “Protocolo para estudos de ictiofauna na área afetada”, encaminhado pelo Parecer Técnico PAR. 02014.000105/2015-20 NUFAUNA/MS/IBAMA e referente à Notificação IBAMA nº 678311-E.

As metodologias e periodicidade do primeiro ano do monitoramento já foram apresentadas em Plano de Trabalho referente à Cláusula 164, alínea “a” e Notificação IBAMA nº 678311-E, cujas atividades encontram-se em andamento. A partir do segundo ano de amostragem da ictiofauna, quando as coletas de dados estiverem sendo realizadas trimestralmente, pretende-se realizar as ações descritas a seguir.

- Estrutura e dinâmica de populações

Será realizado um levantamento de informações obtidas previamente ao acidente, disponíveis na literatura especializada, aliado aos resultados obtidos no primeiro ano de monitoramento da ictiofauna, que está em curso, para construção de uma avaliação quanto à dinâmica das populações nativas da bacia do rio Doce.

Serão apresentadas informações sobre relação peso/comprimento, incluindo teste de adequação à hipótese de crescimento isométrico ou alométrico (quando for possível analisar para sexos separados) e de fator de condição relativo e alométrico (quando for possível analisar para sexos separados).

- Genética de populações

O Anexo 2 define que devem ser feitos estudos genéticos com base em marcadores de microssatélites e marcadores populacionais em 10 espécies mais abundantes de diferentes Famílias, incluindo formas migradoras e não-migradoras, por meio do sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear. Define-se a amostragem de pelo menos 10 loci de microssatélites, duas sequências mitocondriais e duas sequências nucleares de 30 indivíduos de cada população, incluindo as seguintes análises:

- ✓ Estimativa da diversidade genética de espécies do rio Doce depositadas em coleções ou bancos genéticos antes da mortandade causada pelo rompimento da barragem;
- ✓ Estimativa anual da diversidade genética das espécies coletadas na Área Ambiental 1 a partir do segundo ano do programa de monitoramento. Apesar dos estudos genéticos não serem citados quando da definição da periodicidade e tipos de estudos que devem ser conduzidos em cada ano, considera-se que a genética de populações é parâmetro populacional e que é necessária a seleção das espécies mais abundantes para sua realização. Esta seleção é feita após o primeiro ano de monitoramento para os demais parâmetros de populações, seguindo-se aqui a mesma regra;
- ✓ Obter números de frequências alélicas e número de alelos efetivos e privados, o que segundo o Anexo 2 deve ser feito por meio do *software* PopGene v3.3 (RAYMOND & ROUSSET, 1995), e utilizá-los para o cálculo de outras estimativas de variabilidade genética. O mesmo *software* deveria ser utilizado também para os cálculos de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e);
- ✓ Obter estatísticas de composição de nucleotídeos e padrões de substituições inferidos, o que segundo o Anexo 7 deve ser feito por meio do *software* MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013).

A análise de divergência de sequência será inferida pela aplicação do algoritmo Kimura-2-parâmetros (K2P; KIMURA, 1980). Estatísticas de diversidade e polimorfismo de DNA deverão ser aplicadas sobre as sequências dos marcadores para inferência das taxas de

diversidade haplotípica - h (NEI, 1987), diversidade nucleotídica - π (NEI, 1987), AMOVA (EXCOFFIER *et al.*, 1992), endogamia e estruturação populacional - ϕ_{ST} (EXCOFFIER *et al.*, 1992) e ocorrência de eventos de gargalo populacional, entre outros, sendo definido para tal os *softwares* ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2010), DNASP 5.4 (ROZAS *et al.*, 2003) e BOTTLENECK (CORNUET & LUIKART, 1996).

- *DNA Mitochondrial barcoding*

O Anexo 2 define que devem ser realizadas análises com o DNA mitocondrial, para certificação da correta identificação taxonômica das espécies de peixes, por meio do sequenciamento de segmentos parciais do gene mitocondrial COI para cinco indivíduos de todas as espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao longo do período do monitoramento, ou a utilização de amostras de exemplares capturados para outras análises. Especificamente para espécies da Família Characidae, a Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio determina a coleta de 10 exemplares por ponto de coleta. A referida Nota Técnica sugere que as amostras de tecidos coletadas para estas análises sejam brânquia e músculo. A amplificação e sequenciamento dos segmentos deve ser realizada com o uso dos *primers* indicados por Ward *et al.* (2005).

As sequências obtidas serão enviadas ao banco de dados BOLD (RATNASINGHAM & HEBER, 2013) (<http://www.boldsystems.org/>), para verificação da correspondência e similaridade com as sequências já armazenadas.

A identificação de *Barcode gap* e o *Barcode Index Number* (RATNASINGHAM & HEBERT, 2013) serão feitos por meio do site *Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>), sendo também elaborada biblioteca de *DNA barcodes* para espécies nativas sem sequência registrada.

O depósito das sequências obtidas no banco de dados faz com que sejam reconhecidas formalmente como sequências *barcode* das espécies coletadas. Este depósito é feito acompanhado do nome da espécie, número de tombo do exemplar e instituição depositária, nome dos coletores, data e localização (com coordenadas em formato especificado pelo banco

de dados), nome do especialista responsável pela identificação específica do exemplar, sequência da região *barcode* com pelo menos 500 pares de base, informações sobre os *primers* utilizados na amplificação do fragmento de DNA e os eletroferogramas gerados para as duas fitas de DNA (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007).

- Macrófitas aquáticas

Em oito dos 10 pontos do Anexo 2 pertencentes ao estado do Espírito Santo (excluem-se os pontos na foz onde macrófitas não ocorrem) devem ser realizadas coletas de macrófitas aquáticas, em ambas as margens e na calha central do rio Doce. As amostragens terão periodicidade quinzenal, sendo coletadas pelo menos três amostras de material vegetativo por ponto de amostragem. Serão determinadas a temperatura e o pH da água no momento das coletas para auxiliar nas interpretações de testes bioquímicos em laboratório.

O procedimento de coleta será o método do quadro, ou metodologia de Westlake, que consiste na utilização de um quadro de madeira (0,5 m²) para delimitar as parcelas onde o material deverá ser coletado. Os quadros serão lançados em pontos aleatórios dentro da malha amostral. Lançados os quadros, serão coletadas pelo menos três partes de material vegetativo, que serão transferidos para sacos plásticos de material transparente e estéreis. Todo o material coletado será conduzido a laboratórios especializados para as análises específicas. Além das coletas de material para testes específicos, serão coletadas amostras para identificação botânica das espécies. As coletas para identificação botânica seguirão a mesma metodologia das coletas para análise; contudo, o material será armazenado em sacos de papel. Todo material coletado para identificação botânica deverá conter flor e/ou fruto. Depois de coletado, o material para identificação deverá ser prensado para confecção de exsiccatas e conduzido a um herbário registrado, onde será identificado e armazenado em condições adequadas.

- Integridade ambiental

A integridade ambiental de cada ponto de amostragem será avaliada visualmente com base em características fisionômicas. Para isso, serão preenchidas fichas de campo, as quais permitirão avaliar o status dos diferentes habitats.

Uma dessas fichas será baseada no Índice de Integridade do Hábitat (IIH; Nessimian *et al.*, 2008), constituído por 12 itens que descrevem as condições ambientais e avaliam características como o padrão de uso da terra adjacente à vegetação ribeirinha, largura da mata ciliar e seu estado de preservação, estado da mata ciliar dentro de uma faixa de 10 m, descrição da condição do canal quanto ao tipo de sedimento e presença de dispositivos de retenção, estrutura e desgaste dos barrancos marginais do rio, caracterização do leito do rio quanto ao substrato, vegetação aquática, detritos e disposição das áreas de corredeiras, poções e meandros. Cada item é composto de quatro a seis alternativas, ordenadas de forma a representar sistemas cada vez mais íntegros. Os valores obtidos variam em uma escala de 0 (baixa integridade) a 1 (alta integridade).

Outra ficha será baseada no Protocolo de Avaliação Ambiental (PAA; Callisto *et al.*, 2002). Nesse caso, a ficha é composta por 22 itens com três a quatro alternativas. Os 10 primeiros itens analisam as características do trecho que são alteradas por ações antrópicas (pontuação de 0 a 4). Os demais avaliam a integridade das condições naturais do ambiente (pontuação de 0 a 5). Com isso, são definidos três níveis de preservação: 0 a 33 pontos indicam trechos impactados, 34 a 49 pontos são trechos alterados e superior a 50 pontos trechos naturais.

As avaliações de integridade ambiental serão complementadas por medidas de fatores abióticos, tomadas por medidores digitais de campo, tais como: temperatura (°C), pH, total de solutos dissolvidos (TDS), salinidade, condutividade e fluxo.

4.4 Anexo 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)

Este anexo visa implementar um programa de monitoramento na Área Ambiental 1 com coleta e análise de parâmetros sedimentológicos e geoquímicos (granulometria, mineralogia, metais, isótopos, nutrientes e orgânicos) em associação com parâmetros biológicos (composição, estrutura e dinâmica das comunidades planctônicas a partir de coletas periódicas). Este monitoramento será realizado em paralelo com a instalação de um sistema de boias e linhas

de fundeio na plataforma e na foz do rio para determinação da vazão e descarga sólida, distribuídas quanto à profundidade e distância da foz para que sejam medidos parâmetros de forçantes oceanográficas (correntes, ondas e estrutura da coluna d'água), material particulado em suspensão, química de material dissolvido, tamanho do material particulado em suspensão, temperatura e salinidade da água, fluorescência, etc.

O Anexo 3 define também a instalação de uma estação meteorológica na foz do rio Doce, de um marégrafo e de uma estação hidrossedimentológica para monitoramento da vazão e descarga de sólidos.

O estudo proposto prevê a utilização das boias oceânicas, estação meteorológica, marégrafo e estação hidrossedimentológica por cinco anos, com o objetivo de construção de um modelo hidrodinâmico. O monitoramento e estudo da dinâmica da pluma serão acompanhados da validação e calibração de imagens de satélite, visando uma análise espacial da distribuição geográfica da pluma e de parâmetros como MPS, clorofila e temperatura.

4.4.1 Objetivo

Entender as variações interanuais e o comportamento da pluma fluvial de rejeitos no ambiente aquático através do controle dos índices de contaminação/poluição de metais para avaliar os ambientes afetados.

4.4.2 Área de Estudo

O monitoramento se dará ao longo de toda Área Ambiental 1, sendo os pontos de amostragem na porção capixaba do rio Doce os mesmos dos Anexos 1 e 2 do TR4, com adições de pontos na APA Costa das Algas, na foz do rio Doce, Barra Nova e Abrolhos (Quadro 6). Os pontos adicionais não são numerados no TR4, sendo apresentada somente a numeração dos pontos coincidentes com os Anexos 1 e 2.

Quadro 6 - Pontos de amostragem do Anexo 3 - TR4 na porção capixaba do rio Doce e regiões estuarina, costeira e marinha.

Ponto	Local	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
17	Rio Guandu	288351,08	7828746,17
18	Lagoa do Limão	355688,84	7837447,02
19	Lagoa Nova	377287,60	7855827,03
20	Lagoa Japarana	385766,88	7859664,14
21	Rio Doce	387144,67	7853249,98
22	Rio Doce	410025,62	7837309,00
23	Lagoa do Areão	411472,58	7835831,65
24	Lagoa do Areal	413154,34	7834176,33
25	Lagoa Monsaraz	415912,93	7837161,08
26	Foz do rio Doce	414079,86	7828234,12
-	Costa das Algas	390337,47	7791253,33
		418100,29	7795785,50
		411733,24	7771576,83
		384717,37	7796897,30
		380039,35	7787946,29
		377312,30	7783943,25
-	Foz do rio Doce	423532,19	7829898,27
		419392,04	7823040,29
		428467,28	7815169,60
		411878,67	7816813,49
		437864,09	7807959,95
-	Barra Nova	426146,95	7903599,21
		454268,01	7903337,90
-	Abrolhos	530164,59	8011813,77
		517176,55	8007563,71

Fonte: Anexos 1, 2 e 3, TR4.

Para a amostragem de macroalgas, rodolitos e estruturas recifais é definida malha de pontos específica devido à distribuição destes organismos e características dos estudos (Quadro 7).

Quadro 7 - Pontos de amostragem específicos para macroalgas, rodolitos e fundos recifais.

Localidade	Tipo de estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
Costa das Algas	Macroalgas e rodolitos	385772,33	7799135,25
		384717,37 *	7796897,30 *
		383145,36	7795789,31
RVS Santa Cruz		381051,27	7791249,30
		380039,35 *	7787946,29 *
Costa das Algas		378873,34	7784750,27
		377312,30 *	7783943,25 *
		377272,27	7779265,23
		403523,79	7796449,89
		418100,29 *	7795785,50 *
		415488,30	7785815,21
		412746,34	7777869,19
		411733,24 *	7771576,83 *
		412301,31	7767619,24
		RVS Santa Cruz	381051,27
380039,35			7787946,29
386302,67			7787608,76
Costa das Algas	Fundos recifais	418100,29	7795785,50
		415488,30	7785815,21
		412746,34	7777869,19
		411733,24	7771576,83
		412301,31	7767619,24

* = locais de realização de amostragens para análise de parâmetros físico-químicos da água e sedimento

3.4.3 Metodologias e Periodicidade

A malha de amostragem será adaptativa e constituída por medições a intervalos mensais, trimestrais e semestrais:

Mensal: realizada em 10 pontos na bacia e foz do Rio Doce para caracterização da variabilidade interanual do sistema dulcícola-costeiro-marinho. Nestas estações deverão ser

medidos os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), biomassa de plâncton (fito e zooplâncton), perifíton e sedimento de fundo (química e sedimentologia).

Trimestral: serão acrescentados pontos de amostragem em Vitória, na Área de Proteção Ambiental (APA) Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre (RVS) de Santa Cruz, na foz, em Degredo, Barra Nova e Itaúnas. Nessas estações serão medidos os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), quali-quantitativo de plâncton, macroalgas e rodólitos e sedimento de fundo (bentos, química e sedimentologia).

Semestral: as medições semestrais acontecerão nos mesmos pontos acima (mensal e trimestral) adicionando-se pontos em Abrolhos e Guarapari. Nestes deverão ser medidos os mesmos parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), quali-quantitativo de plâncton, e sedimento de fundo (bentos, química e sedimentologia), acrescidos dos parâmetros de ecotoxicidade descritos no Anexo 1.

Emergenciais: previsão de saídas em eventos episódicos importantes, como cheia do rio Doce (pode ser definido pelo controle de cheias ou nível d'água na bacia), outro desastre e eventos meteorológicos de significância (a ser definido). Parâmetros serão coletados nos levantamentos mensais com amostragem para posterior análise quali-quantitativa de plâncton e bentos.

Medições contínuas: a Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio define a instalação de fundeios em quatro pontos:

- um na foz do Rio Doce, em uma profundidade de 20-25 m;
- um ao norte, a cerca de 20-30 km, em uma profundidade de 20 m;
- um a cerca de 20 km ao sul, também na profundidade de 20 m; e
- um quarto ponto a uma profundidade maior (cerca de 50 m) para servir como ponto controle das condições físicas.

A referida Nota Técnica não fornece as coordenadas para os fundeios nela propostos, por isso não permite comparações com a malha de amostragem proposta no Anexo 3 do TR4.

Fica estabelecido que as coordenadas serão enviadas à CTBio para conhecimento tão logo os fundeios sejam instalados pela equipe executora do projeto.

Os fundeios visam medições de parâmetros físicos, como ondas e correntes, e sensores de turbidez, temperatura, salinidade e fluorescência ao longo da coluna d'água. São previstas linhas com boias, sendo os dados recolhidos pelas ADCPs coletados mensalmente por equipe embarcada.

Quanto aos fundos de rodolitos e recifais, define-se a instalação de sensores de temperatura e turbidez nos fundos de rodolitos dos pontos de amostragem da APA Costa das Algas, em composição com placas do tipo CAU para monitoramento e evolução de organismos incrustantes. Os fundos recifais devem ser monitorados semestralmente através de imageamento por foto-quadrado de parcelas definidas, instalação dos mesmos sensores e de armadilhas de sedimento para serem usadas como traçadores. A área conhecida como “Recifes Esquecidos” deve ser monitorada conforme a metodologia descrita para fundos recifais.

Modelagem Numérica

A modelagem numérica proposta neste acompanhamento é o *Regional Ocean Modeling System* (ROMS) associado ao módulo biogeoquímico PISCES para avaliar o impacto nos compartimentos biológico, geológico e químico do ambiente marinho.

Segundo o Anexo 3, a escolha desta modelagem reflete a natureza e comportamento dos dados já coletados na área de estudo. A modelagem numérica deverá contemplar as forçantes principais já observadas, como a vazão do rio, ventos e a mesoescala, observada com a presença de uma ressurgência costeira. A modelagem deve incluir *inputs* do compartimento bioquímico pela identificação prévia da entrada significativa de nutrientes no ambiente marinho, que favoreceram o desenvolvimento do fitoplâncton e, por consequência, a cadeia trófica.

- Parâmetros físico-químicos da água *in situ*

Em cada ponto de monitoramento será realizada perfilagem contínua da coluna d'água com CTD. A coleta de dados *in situ* será feita de duas formas: coletas de dados de temperatura, salinidade e pressão, além de água em profundidades pré-definidas usando o sistema CTD+Rosette a partir de uma plataforma flutuante em estações previamente definidas. O CTD deverá ser munido de, pelo menos, sensores de turbidez, fluorescência, temperatura da água, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido.

A caracterização hidrodinâmica e o monitoramento de algumas condições oceanográficas serão realizados através da instalação de um sistema de boias e linhas de fundeio na Plataforma Continental, distribuídas quanto à profundidade e distância da foz para que sejam medidos parâmetros de forçantes oceanográficas (p.ex., correntes, ondas e estrutura da coluna d'água).

A linha de fundeio deve contemplar pelo menos uma medição de parâmetros físico-químicos da água junto ao fundo e outra próxima a superfície. Conforme a Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, deve ser instalado um fundeio na foz do Rio Doce, em uma profundidade de 20-25 m; um ao norte, a cerca de 20-30 km, em uma profundidade de 20 m; um a cerca de 20 km ao sul, também na profundidade de 20 m; e um quarto ponto a uma profundidade maior (cerca de 50 m) para servir como ponto controle das condições físicas. A frequência de funcionamento dos equipamentos irá depender da profundidade em que serão alocados. Os ADPs devem operar com medições horárias de corrente e a cada duas horas para medição de altura, período e direção de onda (cita-se que a medição pode ser feita em modelo de *bursts*, com frequência de 2 a 4 kHz). Os dados de temperatura, salinidade e turbidez devem ser obtidos a cada hora em sincronia com os dados de ADP.

Também é determinada a coleta de água para determinação do material particulado em suspensão (MPS) e calibração do *backscatter* dos ADPs, sendo esta com periodicidade mensal no primeiro ano e trimestral nos quatro anos seguintes. Segundo o Anexo 3, a utilização do *backscatter* do ADP para estimar o MPS permite avaliar continuamente a concentração de MPS.

O Anexo 3 define que os fundeios devem permanecer em funcionamento por no mínimo cinco anos. A Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio dispensa o envio de dados em tempo real para uma estação em terra por rádio ou satélite. Dessa maneira, os dados serão coletado mensalmente por equipe embarcada.

- Procedimentos para coleta de água e sedimento

A coleta ao longo da coluna d'água deverá ser feita com garrafa horizontal e seguirá a denominação de superfície (0 a 15 cm), meio (metade da profundidade - variável nos pontos de amostragem) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). Estas amostras servirão para análises de concentração de material particulado em suspensão (MPS - superfície, meio e fundo), geoquímica de metais e orgânicos (superfície e fundo), nutrientes dissolvidos e totais e clorofila-a (superfície e fundo) e medições *in situ* com sonda multiparâmetros nas amostras coletadas (OD, pH, STD, Turbidez, Temperatura, Salinidade).

Deverão ser utilizados frascos de polietileno, preferencialmente, ou de vidro, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita, com batoque de vedação (apenas frascos de vidro) e tampa de rosca. Para as análises de água devem ser obtidas as seguintes amostras, em frascos separados:

- ✓ 2000 ml para determinação de metais associados ao material coloidal;
- ✓ 1000 ml para determinação de mercúrio associado ao material coloidal;
- ✓ 500 mL para determinação de metais totais;
- ✓ 500 mL para determinação de metais dissolvidos.
- ✓ 500 mL para determinação de mercúrio total;
- ✓ 500 mL para determinação de mercúrio dissolvido.

As amostras para análise de mercúrio (Hg) devem ser coletadas separadamente.

Para a limpeza e descontaminação dos recipientes, deve-se rinsar duas vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido nítrico P.A., lavar três vezes com água desmineralizada, rinsar com água milli-Q e deixar secar antes de usar.

As amostras coletadas para análise de metais totais deverão ser preservadas pela adição de gotas de solução de ácido nítrico Suprapur ou destilado até $\text{pH} < 2$ e, em seguida, refrigeradas. Deve-se acrescentar 1 mL de ácido nítrico PA (Suprapur ou destilado) para cada litro de água coletado. Posteriormente, devem ser refrigeradas a 4°C e mantidas até o momento da análise. A adição de ácido à amostra pode ser dispensada caso os frascos enviados para coleta já contenham o ácido necessário para acidificar a amostra a $\text{pH} < 2$.

Para as amostras destinadas à análise de dissolvidos e particulados, deve-se preservar a amostra apenas refrigerada a 4°C até o momento da análise, sem adição de ácido. Os frascos não deverão ser cheios totalmente. Como as amostras serão apenas refrigeradas, é necessário entregá-las ao laboratório para análise em até 24 horas após a coleta.

Para as análises de matéria orgânica dissolvida (MOD), serão coletadas amostras de água da subsuperfície em cada um dos pontos de amostragem (0,5 m) com garrafa de van Dorn horizontal (2 L). As amostras devem passar por filtros Millipore $0,22\ \mu\text{m}$ e mantidas refrigeradas a 4°C e no escuro em frascos âmbar pré-lavados com água destilada e HCL 10% até o processamento.

Para a determinação de clorofila-a e pigmentos as amostras serão coletadas em dois frascos escuros de 1 L, totalizando 2 L, previamente rinsados com a amostra, que devem ser enviados rapidamente para a filtração. Entre a coleta e a filtração, as amostras serão mantidas refrigeradas em isopor com gelo. Antes da filtração, os frascos deverão ser homogeneizados levemente e as alíquotas para filtração medidas com balões volumétricos certificados. As filtrações deverão ser realizadas sob pressão máxima de 200 mmHg, em filtros de fibra de vidro Whatman GF/F 47 mm, e em no máximo 15 minutos. As amostras deverão ser filtradas em duplicata para controle de qualidade analítico. A água deverá ser filtrada no momento da coleta. Imediatamente após a filtração, o filtro deverá ser dobrado em dois, levemente pressionado contra papel toalha para tirar o excesso de água, imediatamente colocado em criotubo previamente identificado e em seguida armazenado em nitrogênio líquido.

Para cada amostra deve-se registrar:

- ✓ o tempo entre a coleta e a filtração;
- ✓ o tempo de filtração; e
- ✓ o tempo total entre o início da filtração e a colocação do filtro no criotubo.

Os filtros serão mantidos em nitrogênio líquido até o momento da extração. Entre as amostras os balões deverão ser rinsados com a próxima amostra (entre amostras da mesma estação) ou lavados com água destilada e posteriormente rinsados com a amostra a ser filtrada (no caso de filtração sequencial de amostras de estações diferentes). Ao final da filtração os balões deverão ser lavados em água destilada e postos para secar.

Amostras para análises de nutrientes serão obtidas pela coleta de 1L de água com garrafa horizontal. A água deve ser armazenada em frascos previamente rinsados, enviada para filtragem o mais rápido possível e depois congelados.

Para a caracterização do Material Particulado em Suspensão (MPS), devem ser coletados de 2L de água, armazenados em frascos refrigerados logo após a coleta. Ainda na embarcação, uma subamostra deverá ter a turbidez medida imediatamente.

A coleta de sedimento de fundo será realizada com *box corer*, buscando-se subamostrar estratigraficamente os estratos, e com busca-fundo Van Veen onde não houver a necessidade de estratificação da amostra. Uma vez aberta, a amostra deverá ser fotografada, identificada pelo número do ponto de amostragem e datada com marcação da hora de coleta. A observação de ocorrência da lama alaranjada na superfície da amostra será registrada e, se possível, sua espessura será mensurada com uma régua.

Deverão ser coletadas subamostras do sedimento seguindo a seguinte metodologia:

- ✓ Metais: espátula de plástico raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter em torno de 5g, armazenada em pote plástico e congelada.

- ✓ **Orgânicos:** espátula de metal raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter em torno de 10g, armazenada em pote de alumínio ou vidro (carcinado) e congelada.
- ✓ **Densidade:** amostrar os centímetros superficiais usando um *eppendorf* ou tubo de 5mL de peso conhecido e seguindo o reconhecimento da lama alaranjada. O volume total coletado deve ser conhecido.
- ✓ **Granulometria e mineral de argila:** amostrar a lama alaranjada superficial, obtendo cerca de 100g de amostra.
- ✓ **Granulometria total:** coleta da amostra total, com cerca de 200g.

Dessa forma, em cada ponto de amostragem será realizada a aferição de todos os parâmetros listados no Quadro 8. Todos os procedimentos analíticos, desde a escolha e limpeza dos recipientes até o processamento, preservação e conservação das amostras, para cada tipo de análise seguirão as determinações do Anexo 3 do TR4.

Quadro 8 - Parâmetros das amostragens de água e sedimento.

Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
Água	Metais	Totais, Dissolvidos, Particulados, Especiação e Mercúrio.
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis. Matéria orgânica dissolvida
	Elementar (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Enxofre.
	Isótopos (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Compostos orgânicos específicos.
	Nutrientes	Fósforo total, Fósforo dissolvido, Orto-fosfato, Nitrito, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Silício e N/P Total.

Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
Sedimento	Parâmetros Físico-químicos	pH, ORP, Salinidade, Temperatura, Alcalinidade, sólidos totais dissolvidos, DBO e DQO, Condutividade elétrica, turbidez, sólidos em suspensão, sólidos totais, sólidos sedimentáveis.
	Biológicos/Balneabilidade	Coliformes Totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> .
	Metais*	Sequencial (frações + total), Terras Raras e Mercúrio. *Alumínio; Arsênio; Bário; Boro; Cádmio; Cálcio; Chumbo; Cobre; Cromo; Ferro; Fluoreto; Fósforo; Lítio; Magnésio; Manganês; Mercúrio; Níquel; Selênio; Vanádio; Zinco; Berílio; Cobalto; Fluoreto; Lítio; Vanádio
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis.
	Elementar	Carbono, Nitrogênio, Arsênio e Enxofre.
	Isótopos	Carbono, Nitrogênio, $^{210}\text{Pb}/^{137}\text{Cs}$ e Compostos orgânicos específicos.
Sedimento	Nutrientes	Especiação de Ortofosfato em Água Intersticial, fósforo total.
	Parâmetros Físico-químicos	ORP, pH.

Fonte: Anexo 3, TR4.

Complementar a isso, coleta de 20 testemunhos será realizada na região entre Aracruz e Barra Nova (ES) para determinação das taxas de sedimentação por meio da análise do Pb 210, fluxo geoquímico e análise granulométrica e composicional na coluna estratigráfica. A testemunhagem será realizada com testemunhos a gravidade/pistão e sempre em réplica para assegurar a disponibilidade de material para todas as análises.

O sedimento deve ser lavado para retirada de sal e colocado para secar em estufa a 40°C pelo tempo necessário à completa retirada de água. Após seco, o sedimento é pesado e peneirado em via úmida em peneira de 63 micrômetros para separação da fração areia. O procedimento de secagem é repetido para a fração areia e esta fração passa por nova pesagem para determinação dos teores de lama e areia. A granulometria da fração areia é determinada por peneiramento de 0,5 em 0,5 Fi e a fração lama deve ser levada ao granulômetro a laser após queima de MO por peróxido. No caso da fração lama não há necessidade de nova secagem, pois o granulômetro utiliza amostras úmidas. Os valores dos teores são determinados pela diferença entre o peso total e o peso da fração areia, resultando no peso da fração lama.

Para verificação da densidade, a amostra de sedimento deve ser coletada em recipiente de volume conhecido e previamente pesado e identificado. Em laboratório, esse recipiente deverá ser imediatamente pesado com o sedimento húmido e levado a estufa entre 40°C e 60°C para secagem. Após secagem, o recipiente é novamente pesado. O valor da densidade molhada será a razão entre a massa da mistura (peso húmido) e o volume da mistura. O valor da massa seca é necessário para arquivamento em caso de necessidade do conhecimento de teores de água para determinação da densidade seca.

A determinação da mineralogia de argila do MPS deve ser realizada através do sedimento fino pulverizado injetado em um difratômetro, com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um *counter* de cintilação e um monocromador de grafite. Os padrões de difração devem ser gravados em modo *stepscan* em passos de 0.02°, a dois segundos por passo. As configurações dos *slits* de divergência, recebimento e espalhamento deverão ser de 0.5°, 0.3 mm e 0.5°, respectivamente. Os padrões de difração deverão ser gravados de 4° a 120°. Deve ser utilizada análise e determinação da composição isotópica e de terras raras do MPS para determinação de procedência geológica e de localização.

Os testemunhos coletados entre Aracruz e Barra Nova devem ser abertos em duas metades, fotografados e subamostrados. A subamostragem será feita no máximo a cada 2 cm. Devem ser separadas alíquotas para determinação dos teores de carbonato de cálcio (dissolução por HCl a 10%) e matéria orgânica (queima em Mufla a 450°C) e análise granulométrica. A granulometria deve ser realizada em peneiramento a úmido para separação das frações lama e

areia. Posteriormente, a fração areia será peneirada a seco a cada 0,5 phi e a fração lama analisada em granulômetro a laser. A alíquota remanescente da dissolução de carbonato de cálcio é usada para separação de minerais pesados por densidade, usando-se bromofórmio.

Pelo menos 10 subamostras devem ser analisadas para mineralogia de argilas e de minerais pesados, igualmente espaçadas ao longo do registro sedimentar. A metodologia para definição dos argilo-minerais será por difratometria de raio-x. O sedimento fino será pulverizado e, em seguida, injetado em um difratômetro com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um *counter* de cintilação e um monocromador de grafite. Os padrões de difração serão gravados em modo *step-scan* em passos de 0.02°, a dois segundos por passo. As configurações dos *slits* de divergência, recebimento e espalhamento serão de 0.5°, 0.3 mm e 0.5°, respectivamente. Os padrões de difração serão gravados de 4° a 120°.

A análise geoquímica de metais e orgânicos será realizada nas alíquotas definidas, sendo no mínimo 10 subamostras espalhadas ao longo do testemunho de acordo com a metodologia já descrita neste documento.

A espessura do depósito será investigada através de um levantamento geofísico com um perfilador de subfundo de alta frequência, usando um sistema de multifrequência variando de 20 a 0,5 kHz. O perfilador terá alta definição na superfície e permitirá o mapeamento dos refletores nos primeiros metros do depósito, o que possibilitará a identificação do refletor relacionado ao rompimento da barragem e que servirá de controle para levantamentos futuros. O levantamento será novamente realizado após três anos para comparação de espessura do depósito.

- Procedimentos para amostragem da biota

Bentos - sedimento inconsolidado

A coleta das amostras será feita em substrato inconsolidado com o lançamento de amostradores tradicionais (*Box corer*, Van Veen) apropriados para este ambiente. A amostragem será feita em triplicata, garantindo que seja destinada uma amostra da primeira

réplica para análise granulométrica. As amostras serão fotografadas logo quando o amostrador for içado a bordo.

As amostras serão separadas em alíquotas e uma alíquota de cada réplica deve ser fixada em formol 10% tamponado com bórax. Todas as amostras e alíquotas deverão ser peneiradas utilizando malha de 500 μm . Quando presente, a água contida no interior do amostrador deverá ser sifonada e filtrada utilizando malha de 45 μm . A segunda alíquota deverá ser congelada para análise de sequenciamento genético.

Amostras de macrofauna serão peneiradas ainda a bordo em malha de 1mm e preservadas até triagem e identificação. Animais vivos serão separados, também a bordo, e congelados. A metodologia para análise ecotoxicológica destes organismos deve seguir o descrito no Anexo 1 do TR4.

As análises do material triado irão considerar nível taxonômico até Família, no mínimo. A partir dos dados obtidos deverão ser calculadas a riqueza S, a diversidade α aparente de Shannon-Hill, a diversidade α real de Shannon-Wiener e a Dominância de Simpson. Para a estimativa das similaridades entre os pontos de amostragem em modo Q (elementos amostrais) e em modo R (espécies), deverá ser adotado o índice de similaridade de Kulczynski, usando o *software* PRIMER 5.0. As similaridades entre os pontos de amostragem quanto à composição faunística associada aos fatores físicos deverão ser analisadas pelo método de ordenação utilizando MDS (*non-metric multidimensional scaling*).

Macroalgas e Rodolitos

Amostragens quantitativas e qualitativas de macroalgas e rodolitos serão realizadas em áreas rasas, por mergulho autônomo, draga do tipo retangular e/ou rede de arrasto de fundo para identificação e realização de índices ecológicos, como de riqueza, e análise de vitalidade dos rodolitos. O fundo será fotografado para registro da sua estrutura. Um mínimo de 30 nódulos de rodolitos devem ser coletados. Na embarcação, os rodolitos deverão ser devidamente etiquetados e preservados em formaldeído a 10%. Fragmentos dos rodolitos deverão ser

separados antes da preservação e mantidos em nitrogênio líquido para posterior análise microbiológica.

A flora bentônica associada aos rodolitos também será triada. Para identificação dos grupos taxonômicos (algas calcárias e macroalgas) será utilizada bibliografia específica. Quando necessário, amostras específicas deverão ser enviadas a especialistas. A partir dos dados obtidos, serão determinados a riqueza S da comunidade, a diversidade α aparente de Shannon-Hill, a diversidade α real de Shannon-Wiener e a Dominância de Simpson. A similaridade será determinada pelo o índice de Kulczynski.

Amostras serão separadas para testes de toxicidade, seguindo a metodologia já definida neste documento. Os estudos de ecotoxicologia visam a avaliação de possíveis efeitos fisiológicos decorrentes da contaminação da água por metais e consequente acumulação desses metais nos organismos, avaliando a concentração de metais e biomarcador de dano biológico (lipoperoxidação).

Para monitoramento da fauna e flora associada ao material coletado e nos fundos de rodolitos, devem ser instaladas 10 estruturas de placa de incrustação do tipo *Calcification Acidification Unit* (CAU) em diferentes localidades e habitats. Esta metodologia consiste no uso de duas placas paralelas de 10 x 10 cm feitas de PVC Tipo I na cor cinza. Cada CAU deverá ser instalado e retirado dentro de um período máximo de 12 meses. As placas serão utilizadas por até cinco anos, prazo de duração deste Programa de Monitoramento.

A composição e abundância dos organismos que colonizarem as placas devem ser comparadas com os organismos dominantes no habitat natural adjacente. Sugere-se que as placas sejam instaladas em ambientes impactados e não-impactados e que sejam comparadas as taxas de colonização nos dois ambientes, em lugar de se comparar placas colonizadas por 12 meses com ambientes naturais já estabelecidos. Acredita-se que isto trará respostas mais assertivas sobre os padrões de colonização nos dois tipos de amostra e maiores possibilidades de identificação e mensuração do impacto nestes organismos. Junto aos CAUs devem ser instalados *dataloggers* para registro da temperatura, turbidez, luminosidade e pH durante o período de incubação das placas em cada sítio.

Fitoplâncton, perifíton, zooplâncton, macrófitas aquáticas e ictioplâncton

Nos 10 pontos da bacia do rio Doce serão colhidas amostras específicas para fitoplâncton, perifíton, zooplâncton e macrófitas aquáticas, seguindo as metodologias descritas no Anexo 2.

Para a foz e região estuarina serão utilizados arrastos verticais de zooplâncton com rede tipo WP-2 de fechamento com malha de 200 μm e fluxômetro mecânico na abertura da boca da rede. Em profundidades superiores a 5 m e inferiores a 30 m, serão feitas coletas verticais até metade da profundidade e da metade da profundidade até a superfície, visando evitar perdas pela migração dos organismos. Acima de 30 m as coletas serão feitas do fundo até 30 m e depois segundo o padrão descrito acima. As coletas de zooplâncton serão realizadas, sempre que possível, no período noturno. Cada amostra será colocada em frasco de polietileno de 500 mL devidamente rotulado e fixada em formalina a 4% tamponada com tetraborato de sódio, colocada no frasco antes da amostra. O volume do frasco deve ser completado até cerca de 400 mL com a água do mar utilizada para retirar a amostra do copo da rede.

As coletas de ictioplâncton serão realizadas por meio de arrastos de cinco minutos na superfície para coleta de ovos e larvas de peixes. Os arrastos serão feitos com rede Bongo de 500 μm de malha e deverão ser oblíquos de toda a coluna d'água a uma velocidade máxima de dois nós. As amostras devem ser preservadas em potes plásticos de 500 ml contendo formalina a 10% tamponada com tetraborato de sódio. O volume do frasco deve ser completado até cerca de 400 mL com a água do mar utilizada para retirar a amostra do copo da rede.

As amostras qualitativas de fitoplâncton deverão ser coletadas por meio de arrasto vertical com rede de 60 μm , sendo também fixadas em formalina.

As amostras devem ser armazenadas em local seco e obrigatoriamente com fixador dentro do frasco. Serão levados para o embarque dois jogos de redes de coleta extras como precaução contra eventuais perdas ou danos. A rede deve ser cuidadosamente lavada com água doce após cada arrasto, evitando contaminação entre os pontos de amostragem.

- Análise de metais em água

Metais totais

Para a extração dos metais totais nas amostras de água deverá ser utilizado o método EPA 3015A, que consiste em adição de 4 mL de HNO₃ destilado (*sub-boiling*) + 2 mL de HCl em uma alíquota de 45 mL da amostra e posterior aquecimento em forno microondas. A quantificação dos elementos sob análise será realizada pelo método EPA 6020A e EPA 6010C, que adotam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. O mercúrio (Hg) deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Metais dissolvidos

A amostra deverá ser filtrada em membrana de porosidade 0,45 µm. Será recolhida uma alíquota, que será acidificada (pH < 2) com adição de HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e armazenada até análise. A amostra acidificada deverá ser neutralizada e passada em colunas com resina catiônica (Chelex®) para eliminação de sódio (Na), etapa necessária devido à quantificação ser realizada em ICP-MS. A quantificação dos elementos sob análise deverá ser realizada pelo método EPA 6020A e EPA 6010C, que empregam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. O Hg deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP-MS.

Especiação de metais

A especiação de metais será realizada pela técnica de difusão por filmes finos em gradientes de concentração (DGT - *Diffusive Gradients in Thin Films*), caracterizada por um sistema sequencial com um gel ligante, um gel difusivo e um filtro de acetato de celulose (porosidade de 0,45 µm). Após o período de imersão, os dispositivos devem ser lavados com água ultrapura e colocados em sacos plásticos umedecidos para transporte ao laboratório, onde será feita a abertura dos dispositivos DGT, descarte dos filtros e géis difusivos e inserção dos géis ligantes em tubos Falcon para iniciar o procedimento de eluição dos metais. O processo é

realizado com a adição de HNO_3 destilado (*sub-boiling*) nos tubos e sua agitação orbital por 24 horas. Após a agitação, as resinas são recolhidas e adicionada água ultrapura à solução eluída, sendo as amostras quantificadas pela técnica de ICP-OES.

Metais no material particulado em suspensão

O material particulado em suspensão (MPS) será obtido por meio da filtração de uma alíquota de amostra da água marinha por membrana filtrante de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μm . O material recolhido na membrana será caracterizado quanto à composição geoquímica através das análises descritas à frente. O Hg será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Metais parciais

Na membrana saturada pelo MPS serão adicionados 10 mL de HNO_3 destilado (*sub-boiling*) e aquecida em forno microondas (EPA 3051A). Após a digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos realizada por meio do ICP - MS (Método EPA 6020A).

Terras Raras

A decomposição das amostras de MPS para análise de terras raras será feita pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*), HNO_3 destilado (*sub-boiling*) e H_2O_2 (Merck). Na membrana saturada pelo MPS serão adicionados 10 mL desta mistura de reagentes e aquecida em forno microondas. Após o término da digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos será realizada por ICP - MS (Método EPA 6020A).

- Análise de metais em sedimentos

Metais totais

A decomposição das amostras de sedimentos para análise de metais totais será feita pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*), HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e H₂O₂ (Merck). Em 0,25 g de sedimento previamente liofilizado e macerado deverão ser adicionados 10 mL desta mistura de reagentes e aquecidas em forno microondas. Após a digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos será realizada em ICP - MS (Método EPA 6020A). O Hg será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Metais parciais

Para análise de metais parciais será utilizado o método EPA 3051A (extração parcial). Uma alíquota de 0,25 g de sedimento será liofilizada e macerada (gral e pistilo de ágata), sendo adicionados 10 mL de HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e aquecida em forno microondas. Após a digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos realizada em ICP - MS (Método EPA 6020A).

Extração sequencial de metais

Análise de metais nas diferentes frações dos sedimentos será feita por extração sequencial, conforme Tessier *et al.* (1979). Isto inclui a quantificação de metais em cinco frações distintas, obtidas pela eluição sequencial de uma mesma amostra sedimentar (Quadro 9). Os metais nos diferentes extratos serão quantificados em ICP-MS (EPA 6020A). O Hg será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Quadro 9 - Método de extração sequencial proposto por Tessier *et al.* (1979).

Frações	Método de extração	Componentes sedimentares extraídos
F1 - Trocável	1 M MgCl ₂ , pH 7, 1 h 1 M NaOAc, pH 5 (HOAc), 5 h	Íons trocáveis
F2 - Adsovida/Carbonática	0,04 M NH ₂ OH HCl em 25% (v/v) HOAc, 6 h, 96°C 30% H ₂ O ₂ , pH 2 (HNO ₃), 5 h	Íons adsovidos, carbonatos
F3 - Reduzível	a 85°C, extraído com 3,2 M NH ₄ OAc em 20%	Óxidos de ferro e manganês
F4 - Sulfídica/Orgânica	HNO (v/v), 0,5 h	Sulfetos/Orgânicos
F5 - Residual	HF - HNO ₃ - H ₂ O ₂	Metais ligados em minerais litogênicos

Fonte: Anexo 3, TR4.

Terras Raras

A decomposição das amostras de sedimentos para análise de terras raras será feita pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*), HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e H₂O₂ (Merck). Na membrana saturada pelo MPS serão adicionados 10 mL desta mistura de reagentes e aquecida em forno microondas. Após o término da digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos será realizada por ICP-MS (Método EPA 6020A).

- Mobilidade de contaminantes e modelo de atenuação

Para determinar o alcance da contaminação e os processos dinâmicos que afetam os contaminantes, com o objetivo de buscar melhor entendimento da mobilidade e biodisponibilidade dos contaminantes, serão realizados estudos de mobilidade dos contaminantes.

As análises irão incluir a extração total ou pseudototal, definida pela EPA (US-EPA, 2007) para o maior número possível de elementos (análises multi-elementares ICP-OES ou

ICP-MS). As análises devem incluir minimamente ferro, manganês, alumínio, zinco, cobre, níquel, cromo, arsênio, chumbo, cádmio e mercúrio. Além dos metais, será caracterizado o ambiente sedimentar por meio da medição dos parâmetros físico-químicos: Eh do sedimento (no momento da coleta), pH do sedimento, granulometria ($\% < 63 \mu\text{m}$), carbono orgânico total e enxofre total. A partir das concentrações serão construídos mapas de distribuição pelos métodos de interpolação mais adequados, sendo a krigagem bastante utilizada. Esta abordagem permitirá identificar como o material particulado está se depositando no estuário e avaliar a maneira como os processos geoquímicos controlam esta deposição.

As amostras de sedimento passarão por procedimento para extração da água intersticial, que será analisada por ICP-MS para os mesmos metais analisados no sedimento. O método de extração utilizado com mais frequência é a centrifugação. No entanto, este procedimento não é adequado para coletas feitas no mar, pois o balanço do barco não permite o funcionamento adequado da centrífuga. Assim, nos casos em que esta dificuldade ocorrer, serão adotados métodos que espremam o sedimento (BUFFLAP & ALLEN, 1995).

Será feita a correção pelo alumínio (SEF) de Kemp *et al.* (1976) e o IGeo (*Index of Geoaccumulation*) de Müller (1969) e a correção granulométrica (para a fração $< 63 \mu\text{m}$) amostra a amostra, sendo posteriormente plotadas em mapas de distribuição. Será utilizado o modelo de atenuação de Wasserman & Queiroz (2004), baseado no distanciamento das curvas de concentração do mapa de distribuição. As distâncias entre as curvas de concentração serão medidas e a relação distância pela diferença das curvas determinada, sendo plotado o valor da atenuação na coordenada do ponto mediano, metodologia também aplicada nos trabalhos de Wasserman & Moutella (2004), Souza & Wasserman (2015a) e Ribeiro *et al.* (2013). Será aplicado o procedimento de fracionamento geoquímico pelo método BCR (URE *et al.*, 1993).

Nas amostras com potencial redox negativo, particularmente aquelas em áreas mais protegidas do estuário e nos manguezais da região, será aplicado o método AVS/SEM. Este método consiste no ataque de uma amostra em sistema fechado com ácido clorídrico 6N. O procedimento volatiliza parte do enxofre (ácido-volátil) que é depois capturado em uma coluna *trap* de gás de permanganato de potássio. A solução de ácido clorídrico contém os metais

simultaneamente extraídos e que poderão ser medidos por absorção atômica, ICP-OES ou ICP-MS. Os sulfetos são medidos na solução de permanganato como sulfatos.

- Matéria orgânica dissolvida

Mensuração de carbono orgânico dissolvido (COD)

As concentrações do COD (mg.L^{-1}) serão determinadas pelo método de oxidação catalítica de alta temperatura, utilizando-se o analisador de carbono (TOC). A absorção espectrofotométrica (m^{-1}) do MODC na água, medida também a partir de amostras de água filtradas (filtros Millipore 0,22 μm), será determinada com um espectrofotômetro UV/VIS, utilizando-se cubetas de quartzo e tendo a água Milli-Q como referência (branco). Será realizada varredura do espectro de absorção (250 - 800 nm) de cada amostra em triplicata.

Caracterização da matéria orgânica dissolvida colorida (MODC)

As medidas de absorbância decádicas (A_λ) do MODC obtidas das leituras no espectrofotômetro serão convertidas no coeficiente de absorção (a_λ), que utiliza a base logarítmica Neperiana (log natural), utilizando a fórmula:

$$a_\lambda (\text{m}^{-1}) = 2,303 A_\lambda / r$$

onde:

a_λ = absorbância espectrofotométrica;

r = caminho ótico da cubeta (m).

Os coeficientes serão corrigidos de qualquer ruído pela subtração do valor do coeficiente no comprimento de onda 800 nm de todo o espectro de absorbância. O comprimento de onda na faixa de 350 nm será definido como o índice da concentração da matéria orgânica dissolvida colorida (CDOM350).

A inclinação espectral da curva de absorção do MODC (S) será calculada pela regressão linear dos coeficientes de absorbância log-transformados nos intervalos 275 - 295nm (S275-295). O SUVA254 ($L \cdot mgC^{-1} \cdot m^{-1}$) será calculado dividindo-se a a_{254} (m^{-1}) pela concentração de COD ($mg \cdot L^{-1}$). O E250:365 será estimado a partir da razão entre os coeficientes de absorção a_{250} e a_{365} . O valor Sr será calculado através da razão entre a inclinação espectral (S) obtida entre os intervalos 275 nm a 295 nm (S275-295nm) e 350 a 400 nm (S350-400nm). O índice de fluorescência (FI) será calculado como a razão das intensidades de fluorescência a 470 nm e 520 nm de emissão e 370 nm de excitação.

- Outros orgânicos

Todos os compostos orgânicos listados pelas normativas ambientais do Conselho Nacional de Meio Ambiente do Ministério do Meio Ambiente (Conama/MMA) deverão ser estudados para água e sedimento. Será avaliada a presença de hidrocarbonetos de origem biogênica e antrópica (HC) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), a fim de avaliar a entrada de material relacionado à atividade antrópica. Com o objetivo de melhor avaliar a geoquímica sedimentar e se os processos diagenéticos foram modificados em função do aporte do material de rejeito, deverão ser determinados biomarcadores lipídicos, como triterpenóides, hopanóides, ácidos graxos, entre outros. Para avaliação do aporte de material oriundo de efluentes domésticos e industriais deverão ser determinados esteróis, pesticidas, bifenilaspolicloradas (PCB), tri-butil-estanho (TBT), fenóis e contaminantes emergentes, como fármacos e outros. Também deverá ser verificada a presença de aminas (tanto éter aminas graxas, quanto aminas aromáticas), para utilização como marcadores moleculares do material oriundo da barragem de rejeito.

Hidrocarbonetos (Alifáticos, Hidrocarbonetos Totais de Petróleo, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e biomarcadores lipídicos)

As amostras de sedimento serão armazenadas em *freezer* até os procedimentos laboratoriais para a determinação de hidrocarbonetos. Alíquotas de cada amostra serão liofilizadas e posteriormente homogeneizadas por maceração com auxílio de gral e pistilo. As metodologias a serem utilizadas para a extração e determinação de hidrocarbonetos de petróleo,

HPA e biomarcadores serão baseadas nos protocolos EPA 3540c - *Soxhlet Extraction* (USEPA, 1996), EPA 8270d - *Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography / Mass Spectrometry* (GC/MS) (USEPA, 2007).

Aproximadamente 10 g de sedimento liofilizado e 2 g de cobre ativado para a remoção de enxofre molecular serão adicionados em cartuchos de celulose e extraídos em Soxhlet (12 h / 250 mL de diclorometano). Para verificar a eficiência de extração, em seu início serão adicionados, padrões *surrogates* deuterados às amostras (5 µg n-C20d, 5 µg n-C24d, 5 µg n-C30d e 100 ng de p-terfenil-d14). O extrato bruto obtido será reduzido para aproximadamente 1 mL em evaporador rotatório e reservado para posterior fracionamento. Os processos de *clean up* e fracionamento dos extratos serão feitos em coluna cromatográfica empacotada com 8 g de sílica (ativada a 160°C / 16 h e desativada com 2% m/v de água ultrapura tipo Milli-Q®) e 1 g de alumina (calcina a 450°C / 4 h e desativada com 2 % m/v de água ultrapura tipo Milli-Q®). A fração dos hidrocarbonetos alifáticos (F1) será eluída com 50 mL de hexano; a fração rica em hidrocarbonetos aromáticos (F2) eluída com 70 mL da mistura diclorometano:hexano (1:1 v/v); a F3, contendo esteróis e álcoois, será eluída com 50 mL de acetato de etila; e, por último, a fração contendo ácidos carboxílicos (F4) será eluída com 50 mL de metanol. As frações eluídas serão concentradas em evaporador rotativo e o solvente trocado por hexano ajustado a aproximadamente 1 mL. Em seguida, serão adicionados na F1 e F2 os padrões internos n-C16d (5 µg / mL) e um *mix* de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos deuterados (100 ng / mL), respectivamente, para a determinação dos hidrocarbonetos de petróleo e HPA. Alíquotas das frações F1 e F2 serão reunidas e injetadas para a determinação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Para a quantificação de biomarcadores como terpanos, esteróis e ácidos nas frações F3 e F4 será utilizado o alfa-colestano como padrão interno.

A quantificação e identificação dos compostos será realizada em cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c, ambos equipados com auto amostradores CTC CombiPal, injetor *split/splitless* e coluna capilar DB-5MS (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP será preparada a partir de um *mix* padrão de alcanos (n-C8 - C40) na faixa de concentração de 0,5 a 50,0 µg/mL com padronização interna (n-C16d - 10 µg / mL). A

determinação quantitativa de HTP será feita pela integração da área total dos cromatogramas, englobando toda a fração resolvida e não-resolvida através da determinação da linha de base, descontando-se as áreas dos picos dos padrões. A programação de temperatura deverá ser configurada com a temperatura inicial de 60 °C por 1 min, então 6 °C / min até 300 °C por 30 min. Para as determinações utilizando-se GC-MS, as condições deverão ser as mesmas, com o acréscimo dos parâmetros de temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e quadrupolo: 300°C; 300°C, 200°C e 150°C, respectivamente. A quantificação dos HPA também será realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas serão construídas na faixa de concentração de 5 a 1000 ng/mL utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12) na concentração de 100 ng/mL. Os íons utilizados para a quantificação de HPA prioritários, assim como dos seus respectivos padrões internos, são apresentados no Quadro 10. Os HPA serão determinados por meio de monitoramento *fullscan* (m/z 50-550) e monitoramento de íons selecionados (SIM), seguindo os seguintes atributos: temperatura inicial de 40 °C por 2 min, com taxas de aquecimento de 25 °C / min até 100 °C, 5° C / min até 230 °C, 2 °C / min até 270 °C mantidos por 5 min e 5 °C / min até a temperatura final de 300 °C. Para a determinação dos biomarcadores lipídicos serão utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. Os demais compostos identificados deverão ser determinados em função do padrão interno adicionado, devido à inexistência de padrões comerciais referentes às classes a serem avaliadas.

A identificação dos compostos será feita pela comparação com injeção de soluções contendo padrões autênticos e consulta à biblioteca de espectros de massas NIST do equipamento.

Quadro10 - Íons de quantificação dos 16 HPA e padrões internos.

Padrão	Íons de Quantificação (m/z)	Padrão Interno	Íons de Quantificação (m/z)
Naftaleno	128	Naftaleno-d8	136
Acenaftileno	152	Acenafteno-d10	162, 164
Acenafteno	152, 154	Acenafteno-d10	162, 164
Fluoreno	165, 166	Acenafteno-d10	162, 164

Padrão	Íons de Quantificação (m/z)	Padrão Interno	Íons de Quantificação (m/z)
Fenantreno	178	Fenantreno-d10	188
Antraceno	178	Fenantreno-d10	188
Fluoranteno	202	Fenantreno-d10	188
Pireno	202	Criseño-d12	236, 240
Benzo(a)antraceno	228	Criseño-d12	236, 240
Criseño	228	Criseño-d12	236, 240
Benzo(b)fluoranteno	252, 253	Perileno -d12	260, 264
Benzo(k)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(a)pireno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276, 278	Perileno-d12	260, 264
Dibenzo(a,h)antraceno	278, 279	Perileno-d12	260, 264
Benzo(g,h,i)perileno	276, 277	Perileno-d12	260, 264
p-Terfenil-d14	240, 244	Criseño-d12	236, 240

Fonte: Anexo 3, TR4.

Verificações periódicas referentes à resposta analítica do sistema cromatográfico serão realizadas com injeções dos padrões durante as análises das amostras de sedimento. Nestes ensaios será utilizado como critério de aceitação para controle de qualidade uma variação máxima de 10% no sinal cromatográfico dos padrões injetados dentro da curva analítica previamente construída. Controles de branco de extração, vidraria, ensaios de fortificação e recuperação também serão realizados como controle de garantia das análises.

Valores de recuperação obtidos na faixa entre 70 e 120% serão considerados aceitos como índices de bom desempenho analítico para o método. Cada batelada de extração deverá conter uma prova em branco para avaliação da confiabilidade analítica, representando testes de controle e garantia de qualidade (QA/QC). Ainda como QA/QC, para verificar a precisão e exatidão do método analítico, serão realizadas análises de amostras de sedimento certificado de referência (*Standard Reference Material* NIST 1941b).

Pesticidas clorados e bifenilaspolicloradas (PCBs)

Os sedimentos serão processados conforme método analítico descrito em UNEP (1992). Aproximadamente 100 g de sedimento deverão ser secos em um liofilizador, desagregados utilizando almofariz e pistilo de porcelana, homogeneizados e armazenados em frascos de vidro. Durante as análises, deverão ser adicionados 100 µL de uma mistura de padrões subrogados a aproximadamente 20 g de sedimento seco para a determinação de compostos organoclorados [PCB 103 (C-103N) e PCB 198 (C-198N), AccuStandard, USA]. Posteriormente, serão extraídos em aparato Soxhlet durante 8 h com 80 mL de n-hexano e diclorometano (1:1) (J. Baker, México). Os extratos serão concentrados a 2 mL e submetidos à purificação por cromatografia de adsorção em coluna de alumina, com eluição de 15 mL de uma mistura a 30% de diclorometano em n-hexano para a obtenção da fração contendo os compostos organoclorados. Os extratos resultantes deverão ser então concentrados a aproximadamente 500 µL.

Os PCBs e pesticidas organoclorados serão identificados e quantificados em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas e injetor automático, conforme USEPA 8081b e USEPA 8082. A coluna capilar utilizada deve ter fase estacionária de 5% fenil-metil-siloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. A injeção de 1 µL do extrato da amostra será em modo sem divisão de fluxo (*splitless*). A programação de temperatura do forno terá início em 100°C (1 min) com aumento à taxa de 5°C min⁻¹ até 140°C (1 min), aumentando a 1,5°C min⁻¹ até 250°C (1 min) e 10°C min⁻¹ até 300°C, permanecendo isotérmico por 5 min. A temperatura do injetor será mantida a 300°C.

As amostras de sedimento superficial serão analisadas para Alfa-HCH (BHC), Beta-HCH (BHC), Gama-HCH (BHC), Delta-HCH (BHC), DDT (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), DDE (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), DDD (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), dieldrin, endrin, Alfaclordano, Gama-clordano e o somatório de sete congêneres de PCBs (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) em sua fração total, conforme Tabela III do Anexo da Resolução CONAMA 454/12. A identificação dos pesticidas clorados e PCBs será baseada nos tempos de retenção de padrões autênticos.

A quantificação será realizada contra padrões externos por meio das curvas analíticas de cada analito e os padrões subrogados PCB103 e PCB198. A recuperação da metodologia será avaliada com o uso de 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno (TCMX, M-8082-SS-10X, AccuStandard, USA) como padrão interno e o desempenho analítico por meio da análise de matrizes fortificadas com padrões, replicatas e brancos analíticos.

Éter-aminas e aminas aromáticas

As amostras de sedimento liofilizado (10 g) fortificados com trifenilamina serão extraídas com diclorometano por sonicação (3 x 15 mL) ou por Soxhlet (250 mL) por 12 horas, conforme Alzaga *et al.* (1999). A fração dissolvida de amostras de água (1000 mL) irá passar por cartuchos Lichrolut EN (200 mg) previamente ativados com 7 mL de MeOH a 1 mL.min⁻¹ e, em seguida, 3 mL de água Milli-Q a 1 mL.min⁻¹. Posteriormente serão submetidas à etapa de secagem sob vácuo durante 15 min e a eluição realizada com 3 mL de acetona, seguido de 3 mL de acetato de etila utilizando sistema de extração em fase sólida.

A determinação quantitativa das aminas será feita por cromatografia em fase gasosa equipada com um espectrômetro de massas e amostrador automático. A injeção será realizada no modo *splitless* (ativação em 40 s em 280°C) utilizando hélio como gás de arraste (1 mL.min⁻¹). A temperatura do forno será programada de 90°C (1 min) a 120°C a 10°C.min⁻¹ e, em seguida, a 320°C a 6°C.min⁻¹, mantendo a temperatura final durante 15 min. Serão utilizadas as colunas analíticas DB-5 de 30 m, ID 0,25 mm e espessura de filme 0,25 mm (J & W Scientific). O GC-MSD será no modo eV EI, operando no modo *fullscan* (40-550 uma), temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente.

- Elementar

Carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e enxofre

A caracterização da matéria orgânica será feita por meio de análises sobre composição de seus elementos majoritários, predominância isotópica entre eles e moléculas que formam. As análises da composição elementar (C, N, P, S) nos sedimentos deste estudo serão realizadas

após a descarbonatação, por meio da adição de HCl 1,0 mol.L⁻¹ diretamente nas amostras dentro dos frascos de análises. Este procedimento será repetido por duas vezes, sendo as amostras secas em estufa a 60°C por 12 h.

A determinação dos teores de carbono orgânico (CO) e nitrogênio total (NT) será realizada com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando um analisador elementar (Euro Vector EA3000). Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico serão feitos com padrão certificado.

- Isótopos

Isótopos estáveis (carbono e nitrogênio), ²¹⁰Pb/¹³⁷Cs, compostos orgânicos específicos

Isótopos estáveis: na avaliação do aporte orgânico para os sedimentos da região costeira, a amostra será descarbonatada com o uso de HCl a 10%, lavada com água ultrapura e centrifugada para remoção do sobrenadante. O material residual será seco por liofilização e a análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio (sem a remoção do carbono inorgânico), realizada por meio de um analisador elementar com interface de fluxo contínuo acoplado a espectrômetro de massa com razão isotópica. A razão isotópica de cada amostra deverá ser referenciada contra o material padrão seguindo a fórmula:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{org}} \text{ ou } \delta^{15}\text{N}_{\text{Total}}(\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{Amostra}}}{R_{\text{Padrão}}} \right) - 1 \right] \times 10^3$$

Sendo R a razão ¹³C/¹²C ou ¹⁵N/¹⁴N.

Isótopos ²¹⁰Pb/¹³⁷Cs e taxa de sedimentação: a determinação de ²¹⁰Pb será realizada a partir da medida da emissão de seus raios gama, da ordem 47 keV. O efeito da auto-absorção, devido a emissões menores de 100 keV, será levado em consideração e, para isso, em cada amostra analisada será calculado o fator de auto-absorção, parâmetro utilizado no cálculo da atividade final do ²¹⁰Pb. A atividade do ²¹⁰Pb será calculada pela equação:

$$A_{\text{Pb-210}} = \{ (C.F) - BG \} / (t . m . p\gamma . \epsilon)$$

onde:

$A_{\text{Pb-210}}$ = atividade do ^{210}Pb na amostra (Bq.kg^{-1});

C = número de contagens do ^{210}Pb na amostra;

F = fator de auto-absorção;

BG = número de contagens da radiação de fundo na região do ^{210}Pb (47 keV);

t = tempo de contagem da amostra, em segundos;

m = massa da amostra, em quilogramas;

p = probabilidade de emissão da radiação gama proveniente do ^{210}Pb igual a 0,0418;

ε = eficiência do detector.

A atividade de ^{137}Cs por espectrometria gama é obtida por meio da equação:

$$A_{\text{Cs-137}} = \{(C - BG) / (t.m.p.\gamma.\varepsilon)\}$$

onde:

$A_{\text{Cs-137}}$ = atividade do ^{137}Cs na amostra (Bq.kg^{-1});

C = número de contagens do ^{137}Cs na amostra;

BG = número de contagens da radiação de fundo na região do ^{137}Cs (661 keV);

t = tempo de contagem da amostra, em segundos;

m = massa da amostra, em quilogramas;

p = probabilidade de emissão da radiação gama proveniente do ^{137}Cs igual a 0,850;

ε = eficiência do detector.

A análise do branco para os radionuclídeos em estudo será feita contando-se um pote plástico vazio no mesmo tempo estabelecido para as amostras. Para cada energia será obtido um valor que é considerado radiação de fundo ou *background*. Este valor será subtraído da contagem da amostra, procedendo-se então à determinação da sua atividade.

- Nutrientes dissolvidos (somente em água)

Orto-fosfato, nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal e silício reativo dissolvido

As análises de nutrientes dissolvidos serão feitas por meio de análise de fluxo contínuo (*Continuous Flow Analysis* - CFA) com o uso de um *Seal Autoanalyzer* (AA3), o qual possui métodos certificados pela USEPA.

Silicato: a análise será realizada pela técnica de Armstrong (1967) que consiste na adição de uma solução acidificada de molibdato de amônio na amostra para produzir o ácido molibdico, que é reduzido para ácido molibdoso (composto azul) com a adição de cloreto de estanho II. Para evitar a interferência do fosfato será adicionado ácido tartárico. A amostra irá passar por uma célula de 10 mm e a absorbância medida a 660 nm.

Nitrato + Nitrito: será realizado o procedimento modificado de Armstrong (1967), onde a amostra atravessa uma coluna redutora de cádmio e o nitrato presente quantitativamente reduzido a nitrito. O reagente sulfanilamida será introduzido na amostra, seguido pelo reagente N-(1-naftil) etilenodiaminadicloridrato, que se associam e formam o azo corante vermelho. O fluxo irá passar por uma célula de 10 mm e a absorbância medida a 520 nm.

Nitrito: a análise será realizada conforme descrito para nitrato + nitrito, com a exceção da coluna de cádmio.

Fosfato: será utilizada a modificação do procedimento descrito em Bernhardt & Wilhems com o uso de uma solução ácida de molibdato de amônio adicionada à amostra para a produção do ácido fosfomolibdico, depois reduzida para ácido fosfomolibdoso (composto azul) com a adição de sulfato de dihidrazina. O produto da reação será aquecido a aproximadamente 55°C, para melhorar o desenvolvimento da coloração. O fluxo irá passar por uma célula de 10 mm e absorbância medida a 820 nm.

Nitrogênio Amoniacal: será utilizado uma modificação do procedimento de Koroleff (1969, 1970). O nitrogênio amoniacal será analisado via reação de Berthelot, no qual ácido

hipocloroso e fenol reagem com a amônia em uma solução alcalina para formar o azul de indofenol. A amostra irá passar por uma célula de 10 mm e a absorbância medida a 660 nm.

Alternativamente, os nutrientes dissolvidos poderão ser dosados pelo uso de cromatografia iônica, com a vantagem de redução de volume de amostras, tempo de medição e utilização de maior número de amostras.

Nitrogênio e fósforo totais

Análises de nutrientes totais serão feitas por prévia digestão com persulfato de potássio, conforme Valderrama (1981), e analisadas por fluxo contínuo (*Continuous Flow Analysis - CFA*), de acordo com os métodos para nitrato e ortofosfato descritos anteriormente.

Especiação de fósforo (P)

Para verificar o carreamento de compostos fosfatados no rio Doce pela lama de rejeitos de minério e aportados na plataforma continental, serão realizadas análises de fosfato em diferentes matrizes sedimentares.

Será utilizado o método de Anschutz & Deborde (2016), onde é feita extração sequencial para a mensuração de fósforo em água intersticial P-trocável, P-ligado a ferro, P associado a apatita biogênica, P associado a apatita autigênica e carbonato, P associado a apatita detrital e formas inorgânicas e P orgânico.

As etapas de extração são apresentadas no Quadro 11. Cada extrato será analisado por colorimetria segundo Murphy & Riley (1962).

Quadro 11 - Etapas de extração de fósforo (P)

Fração extraída	Extrator (tempo)	Reação química
P-trocável	$\text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O} +$ tolueno 3x24h	Desorção sem atividade bacteriana em água artificial

Fração extraída	Extrator (tempo)	Reação química
P-ligado a ferro (III) amorfo	Ascorbato (20 g/L) 24h	Redução de óxidos de ferro (III) amorfo e dissociação do P
P-ligado a ferro (III) cristalino	ditionitocitrato bicarbonato 4h	Dissociação de óxido de Fe (III) redutível e P associado
P-ligado a Hidroxiapatita autigênica	NH ₄ Cl (2M) 16h	Dissociação da hidroxiapatita e P associado
P-ligado a apatita carbonática autigênica	Acetato de Sódio 16h	Dissociação da apática carbonática e P associado
P-ligado a apatita detrital e carbonato	HCl (1M) 16h	Dissociação ácida de carbonatos e apatita
P-orgânico	H ₂ SO ₄ (18M) 16h	Dissociação ácida da matéria orgânica

Fonte: Anexo 3, TR4.

- Clorofila-a e Feopigmentos

A extração irá seguir a metodologia de Wright & Jeffrey (1997) com modificações.

A extração da clorofila-a e de feopigmentos será realizada em um ambiente escuro ou de penumbra. Para a extração dos pigmentos, será utilizada pinça de ponta fina e cada filtro será acomodado em um tubo Falcon de 15 mL encapados com papel alumínio e fita, garantindo que não ocorra penetração de luz. Serão adicionados 10 mL de acetona 90% em cada tubo e as amostras mixadas por um minuto ou até que o filtro esteja dilacerado. Ao final da mixagem, os tubos serão armazenados em geladeira, ao abrigo da luz, por 24 horas.

Após refrigeração, as amostras serão centrifugadas por cinco minutos, transferidas para outros tubos Falcon limpo e centrifugadas por mais cinco minutos, garantindo que todo o material seja sedimentado e extraído. A leitura no espectrofotômetro será iniciada imediatamente após a centrifugação das amostras, que serão transferidas para as cubetas, encaixadas no equipamento e realizadas as leituras nos comprimentos de onda de 665 nm, 647 nm, 630 nm e 750 nm, anotando em uma planilha as absorbâncias de cada comprimento de onda. É necessário “zerar” a leitura com acetona 90% a cada mudança de comprimento de onda.

Após a leitura dos comprimentos de onda, em cada cubeta serão acrescentadas duas gotas (0,1 mL) de HCl (0,2 M) para a conversão de clorofila-a para feopigmentos. São então realizadas novas leituras no espectrofotômetro, anotando suas respectivas absorbâncias nos comprimentos de onda de 665 nm, 647 nm, 630 nm e 750 nm.

- **Material Particulado em Suspensão (MPS)**

Para determinação da concentração do MPS será utilizado o método gravimétrico com filtragem da água em filtro de fibra de vidro com 47 mm de diâmetro e poro de 0,7 μ m. Os filtros devem ser pesados previamente e secos em estufa a 40°C. Depois de filtrado, os filtros devem ser secos em estufa a 40°C.

Após esse procedimento, os filtros serão colocados em dessecador para evitar absorção de umidade e serem pesados e identificados individualmente.

Será filtrada uma quantidade conhecida de água, que nesse caso dependerá da concentração. Em áreas com excesso de MPS não há necessidade de filtrar 1 L, mas para áreas de menor concentração a filtragem deve ser de 1 L, no mínimo. O filtro será lavado em água deionizada após a filtragem, para retirada de sal.

As amostras serão filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo. Posteriormente, os filtros contendo o material em suspensão serão secos em estufa por 48 horas a temperaturas entre 40 °C e 60°C e novamente pesados. A diferença do peso antes e depois da filtragem corresponde à concentração de MPS, em mg/L. Para determinação do teor de Matéria Orgânica (MO) das amostras de MPS, os filtros serão incinerados em mufla a 550°C por 5 horas.

- **Sedimento - Granulometria e Composição**

O sedimento será lavado em água doce para retirada de sal e colocado para secar em estufa a 40°C pelo tempo que for necessário para completa retirada de água. Após a secagem, o sedimento será pesado e peneirado via úmida em peneira de 63 μ m para separação da fração areia. O procedimento de secagem da fração areia será repetido e feita nova pesagem desta

fração para determinação dos teores de lama e areia. A granulometria da fração areia será determinada por peneiramento de 0,5 em 0,5 Fi e a fração lama levada ao granulômetro a laser após queima de MO por peróxido. No caso da fração lama, não há necessidade de novo procedimento de secagem, pois o granulômetro usa amostras úmidas. Os valores dos teores serão determinados a partir da diferença entre o peso total e o peso da fração areia, resultando no peso da fração lama.

Densidade

A amostra será coletada em recipiente de volume conhecido e previamente pesado e identificado. Em laboratório, o recipiente será imediatamente pesado com o sedimento úmido e levado a estufa entre 40°C e 60°C para secagem. Após seco, o recipiente será pesado novamente. O valor da densidade molhada será a razão entre a massa da mistura (peso úmido) e o volume da mistura. O valor da massa seca é necessário para arquivamento em caso de necessidade do conhecimento de teores de água para determinação da densidade seca.

A determinação da mineralogia de argila do MPS será feita por meio do sedimento fino pulverizado, que em seguida será injetado em um difratômetro com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um *counter* de cintilação e um *monocromator* de grafite. Os padrões de difração serão gravados em modo *stepscan* em passos de 0,02°, a dois segundos por passo. As configurações dos *slits* e divergência, recebimento e espalhamento serão de 0,5°, 0,3 mm e 0,5°, respectivamente. Os padrões de difração deverão ser gravados de 4° a 120°. A análise e determinação da composição isotópica e de terras raras do MPS será usada para determinação de procedência geológica e localização.

Testemunhos

Os testemunhos para análise sedimentológica serão abertos em duas metades, fotografados e subamostrados. A subamostragem será a cada 2 cm, no máximo. Alíquotas serão separadas para determinação do teor de carbonato de cálcio (dissolução por HCl a 10%), teor de matéria orgânica (queima em Mufla a 450°C) e análise granulométrica. A granulometria será realizada em peneiramento a úmido para separação da fração lama e areia. Posteriormente, a

fração areia será peneirada a seco a cada 0,5 phi e a fração lama analisada em granulômetro a laser. A alíquota restante da dissolução de carbonato de cálcio será usada para separação de minerais pesados por densidade, usando bromofórmio.

Pelo menos 10 subamostras serão analisadas para mineralogia de argilas e de minerais pesados, igualmente espaçadas ao longo do registro sedimentar. A metodologia para definição dos argilo-minerais será por difratometria de raio-x. O sedimento fino será pulverizado e, em seguida, injetado em um difratômetro com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um *counter* de cintilação e um *monocromator* de grafite. Os padrões de difração serão gravados em modo *stepscan* em passos de 0,02°, a dois segundos por passo. As configurações dos *slits* de divergência, recebimento e espalhamento deverão ser de 0,5°, 0,3 mm e 0,5°, respectivamente. Os padrões de difração serão gravados de 4° a 120°.

A análise geoquímica de metais e orgânicos será feita nas alíquotas amostrais e definidas, sendo no mínimo 10 subamostras espalhadas ao longo do testemunho de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

Análise de clorofila

A extração da clorofila-a e de feopigmentos será feita conforme Wright & Jeffrey (1997), com modificações, sendo realizada em um ambiente escuro ou penumbra. Para a extração dos pigmentos, com uma pinça de ponta fina cada filtro deverá ser acomodado em um tubo Falcon de 15 mL encapados por papel alumínio e fita, garantindo que não ocorra penetração de luz dentro do tubo. Serão adicionados 10 mL de acetona 90% em cada tubo e as amostras serão mixadas por 1 minuto ou até que o filtro esteja dilacerado. Ao final da mixagem os tubos serão armazenados em geladeira, ao abrigo da luz, por 24 horas.

Após refrigeração, as amostras serão centrifugadas por cinco minutos, transferidas para outros tubos Falcon limpos e centrifugadas por mais cinco minutos, garantindo que todo o material seja sedimentado e extraído. A leitura no espectrofotômetro será iniciada imediatamente após a centrifugação das amostras, que deverão ser transferidas para as cubetas, encaixadas no equipamento e realizadas as leituras nos comprimentos de onda de 665 nm, 647

nm, 630 nm e 750 nm, anotando em uma planilha as absorbâncias de cada comprimento de onda. É necessário “zerar” a leitura com acetona 90% a cada mudança de comprimento de onda.

Após a leitura dos comprimentos de onda, em cada cubeta serão acrescentadas duas gotas (0,1 mL) de HCl (0,2 M) para a conversão de clorofila-a para feopigmentos. São então realizadas novas leituras no espectrofotômetro, anotando suas respectivas absorbâncias nos comprimentos de onda de 665 nm, 647 nm, 630 nm e 750 nm.

- Análise do Plâncton

Fitoplâncton

As amostras qualitativas coletadas pelo arrasto vertical com rede de 20 μ m (para os 10 pontos da bacia localizados no Espírito Santo) e 60 μ m (para a foz e região estuarina) serão identificadas em microscópio óptico equipado com câmera digital e auxílio de bibliografias especializadas. Cada espécime representante de um táxon será fotografado, desenhado, medido e receberá um código de identificação. Serão utilizadas chaves taxonômicas revisadas e atualizadas, mas quando não for possível a identificação em nível específico, as amostras serão identificadas em nível genérico, de acordo com morfotipos baseados na forma e dimensões, ou registradas em seu menor nível taxonômico possível. Será também realizada análise crítica da lista de táxons para confirmar a adequação da ficoflórula ao local em função da metodologia de análise, revisão da taxonomia e enquadramento taxonômico. Os nomes científicos seguirão o disposto em bancos de dados internacionais.

Das amostras quantitativas coletadas na superfície e na segunda profundidade, o volume total (1 litro) de cada amostra irá passar por processos sucessivos de sedimentação, seguido por retiradas do sobrenadante com auxílio de bomba a vácuo, até a redução do volume para 250 mL sem qualquer tipo de filtração. A amostra resultante será estocada em frasco de polietileno com batoque. Para contagem do fitoplâncton, será adotado o método de sedimentação de Uthermöhl (1958), com a utilização de câmaras de 50 mL por um tempo mínimo de sedimentação de 48 horas. Em todos os processos de sedimentação será utilizado o critério de Sournia (1978), que prevê um tempo mínimo de 4 horas de sedimentação para cada 1 cm de altura da coluna d'água.

A contagem dos organismos será feita em microscópio invertido com aumento de 400x e com base na técnica de campos aleatórios de Uehlinger (1964), gerados por programa de computador. A determinação do número de campos a serem contados será realizada segundo Lund *et al.* (1958) e deverá alcançar 100 indivíduos da espécie mais abundante, permitindo intervalos de confiança de aproximadamente 20% da média, a um nível de significância de 95%, considerado suficiente para este tipo de estudo. Entretanto, será adotada a contagem mínima de 25 campos para cada amostra, mesmo que a espécie mais abundante já tenha superado o total de 100 indivíduos contados, com o objetivo de obter maior confiabilidade dos dados. Serão contados os indivíduos e o número de células, no caso de organismos pluricelulares.

A densidade numérica será expressa em indivíduos.mL⁻¹ e/ou células.mL⁻¹ e calculada segundo a fórmula modificada de Wetzel & Likens (1979). Estes valores também poderão ser expressos em indivíduos.L-1 e/ou células.L-1, a depender da escala dos resultados.

A partir dos valores de densidade do fitoplâncton serão calculados os índices de diversidade específica (bits.indivíduos⁻¹ e/ou bits.células⁻¹ (SHANNON & WEAVER, 1949) e de equitabilidade (PIELOU, 1975 *apud* LEGENDRE & LEGENDRE, 1983).

Concomitantemente às contagens, serão realizadas análises morfométricas para a avaliação do biovolume celular. Os espécimes encontrados durante a contagem serão registrados com câmera digital acoplada ao microscópio, o que irá subsidiar o cálculo da biomassa pelas medições de suas dimensões.

Zooplâncton

As amostras deverão ser fracionadas de acordo com a densidade de organismos nas amostras. Para obtenção de subamostras do ambiente marinho, será utilizado o partidor *Folsom Plankton Sample Splitter* (Hidrobios®), sendo o número de divisões (1/2, 1/4, 1/8... até 1/1024) realizado de modo a garantir a presença de pelo menos 1.000 espécimes na alíquota. Para os ambientes de água doce, subamostras deverão ser retiradas com pipeta tipo Stempel até que um

mínimo de 200 indivíduos da espécie dominante seja contabilizado. A contagem das subamostras será feita em Câmara de Sedgewick-Rafter sob microscópio óptico. As amostras de pequeno volume serão contadas integralmente.

As subamostras obtidas serão analisadas sob microscópio estereoscópico utilizando câmaras de Bogorov para separação em grandes grupos taxonômicos. Em seguida serão identificados os componentes do zooplâncton ao menor nível taxonômico possível, utilizando bibliografia especializada (e.g. BOLTOVSKOY, 1999; BONECKER, 2006; entre outros) e, quando necessário, microscópio óptico será utilizado para identificação de partes específicas dos organismos para subsidiar esta análise. A nomenclatura dos táxons seguirá o banco de dados internacional ITIS - *Integrated Taxonomic Information System* (<http://www.itis.gov>) para verificação da validade do nome.

Ictioplâncton

Os ovos e larvas de peixes serão totalmente triados das amostras coletadas, tanto na malha de 500 μm da rede Bongo quanto na neustônica. No caso da quantidade de ovos ser muito grande poderá ser realizado o fracionamento com o *Folsom Plankton Sample Splitter* (Hydrobios®), mas serão triados ao menos 100 indivíduos. O fracionamento será realizado apenas para o grupo de ovos que for mais abundante. Em determinadas amostras os ovos elípticos podem ser pouco abundantes e não deverão ser fracionados, enquanto os ovos redondos não ornamentados podem estar presentes em grande número, sendo necessário fracioná-los. O número total de ovos e larvas de peixes coletados com a rede Bongo será expresso por 100 m^{-3} (ovos/larvas.100 m^{-3}) e por 1000 m^2 (ovos/larvas.1000 m^{-2}) para as amostras da rede neustônica.

Após identificação, os ovos de peixes serão preservados em formol tamponado a 4% e as larvas de peixes em álcool a 70%, com exceção das larvas do grupo Leptocephali, que serão preservadas em formol tamponado a 4%.

A identificação dos ovos e larvas de peixes será realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, utilizando alguns parâmetros merísticos e morfométricos. Serão usadas

referências bibliográficas especializadas, como Moser *et al.* (1984), Moser (1996), Matsuura & Olivar (1999), Richards (2006), Bonecker & Castro (2006), Fahay (2007), Bonecker *et al.* (2012), entre outros.

A classificação do ictioplâncton será baseada em Nelson (2006) e todas as espécies identificadas deverão ser checadas no ITIS - *Integrated Taxonomic Information System* (<http://www.itis.gov>) para verificação da validade do nome.

- Análise de Dados Físico-Químicos e de Fundeio

Os dados obtidos por CTD serão analisados para gerar perfis de variação dos parâmetros ao longo da profundidade e variação espaço-temporal destas informações. Os dados de fundeio serão analisados como séries temporais e interpretados com base na variabilidade dos diversos parâmetros.

- Avaliação dos Habitats

Mapeamento dos habitats bentônicos da Plataforma Continental adjacente à foz do rio Doce

Em complemento às amostragens de sedimento superficial, será realizado levantamento geofísico através de mapeamento acústico com sonar de varredura lateral e/ou batimetria de multifeixe com *backscatter* (frequência entre 100 e 600 kHz) cobrindo a área de enfoque deste trabalho. É necessário que haja, no caso do levantamento com sonar de varredura lateral, um dado batimétrico para caracterização da profundidade e feições morfológicas. Amostras de sedimento superficial serão utilizadas para calibração do sinal de retorno do sonar e caracterização e estudo da comunidade bentônica. O mapeamento será inicialmente realizado através de transectos perpendiculares à costa, entre as isóbatas de 10 e 40m, a cada 2 km. A varredura será ajustada de acordo com a profundidade, não menos do que 100 m para cada lado. Este mapeamento inicial será realizado entre as coordenadas 18°20'S 39°38'W e 20°13'40"S 40°11'6"W.

Na área em frente à foz do Rio Doce será realizado levantamento de batimetria multifeixe com *backscatter* (frequência entre 200 e 300kHz) entres os vértices do polígono - 39.69312, -19.24923/-39.43701, -19.37932/-39.83744, -19.98300/-40.07932, -19.86918. A segunda área de mapeamento com batimetria de varredura será na região de ocorrência de recifes já conhecida (Recifes Esquecidos e a região da APA Costa das Algas), cujos vértices são -39.59970, -18.36134/-39.38643, -18.38708/-39.47100, -18.97357/-39.68427, -18.93864.

A caracterização do habitat será realizada por método direto, envolvendo o imageamento do fundo e coleta de material. O imageamento do fundo será feito por transectos de vídeos, em todos os habitats mapeados. Estes transectos terão no mínimo 2 km de comprimento e estarão distribuídos para serem representativos dos habitats. A metodologia para realização dos transectos será feita por veículo autônomo submerso (AUV) semi-profissional que possua capacidade de gerar imagens em alta resolução georreferenciadas e ter gravação de dados de profundidade para que as imagens possam ser corretamente plotadas ao longo do transecto e posteriormente integradas com pontos amostrais e com o mapeamento acústico. As imagens devem também apresentar informação de escala do fundo e rumo.

Registros videográficos serão selecionados e recortados em 30 quadros estáticos, permitindo estimar a densidade dos principais organismos visualizados e a forma, tamanho, vitalidade e cobertura dos elementos das formações recifais, bancos de rodolitos e fundos lamosos/arenosos, lamosos e cascalhosos. As análises das imagens serão conduzidas em programas como *Coral Point Count with Excel Extensions* e *ImageJ* (National Institute of Health). A partir dos dados obtidos serão calculadas a riqueza S, a diversidade α aparente de Shannon-Hill, a diversidade α real de Shannon-Wiener e a Dominância de Simpson. Para a estimativa das similaridades entre os pontos amostrais em modo Q (elementos amostrais) e em modo R (espécies), será adotado o índice de similaridade de Kulczynski, usando PRIMER 5.0.

As similaridades entre os pontos de amostragem quanto à composição faunística associada aos fatores físicos serão analisadas pelo método de ordenação utilizando MDS (*non-metric multidimensional scaling*). A análise dos dados acústicos será integrada com verdades de campo (amostras de fundo) e imageamento do fundo marinho para elaboração de um mapa de habitats.

A periodicidade das atividades de mapeamento de habitats aqui prevista será trimestral no primeiro ano e semestral nos anos seguintes, conforme Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio.

Fundos Recifais

A caracterização de comunidades bentônicas de fundos recifais será feita com base na estimativa da cobertura relativa do substrato utilizando a metodologia de foto-quadrado em parcelas fixas (FRANCINI-FILHO *et al.*, 2008). Cada amostra será composta por um mosaico de 15 fotos de alta resolução, somando uma área de 70 cm². Serão amostrados 10 quadrados fixos (delimitados permanentemente por pinos metálicos fixados ao substrato) por habitat (topo e parede), os quais deverão ser distribuídos aleatoriamente antes da fixação. A coleta de amostras deverá ser determinada em campo para posterior análise do impacto. As coletas serão realizadas nos fundos recifais potencialmente impactados, os chamados Recifes Esquecidos, localizados a cerca de 60 km ao norte da foz do Rio Doce, na região de Itaúnas, e nas estruturas recifais localizadas na APA Costa das Algas e no RVS de Santa Cruz.

Para determinação de taxas de sedimentação e composição do material sedimentar, cinco armadilhas de sedimento serão instaladas na superfície dos recifes. Em cada recife monitorado, serão instalados ainda sensores de turbidez e temperatura para monitoramento de condições abióticas. O material coletado nas armadilhas será analisado para composição mineralógica, geoquímica de metais e granulometria.

Em cada recife monitorado, serão coletadas amostras de água para análises geoquímicas de metais, orgânicos e elementares. O monitoramento nos recifes será feito em, no mínimo, três estruturas, com frequência trimestral no primeiro ano. No segundo ano, após avaliação, a frequência passará a ser semestral.

A avaliação da condição fisiológica dos corais (i.e., eficiência fotossintética das zooxantelas) será realizada *in situ* através da técnica de Fluorometria de Amplitude de Pulso Modulada (APM) utilizando-se um fluorômetro subaquático DIVING-PAM *Underwater*

Fluorometer (Walz GmbH, Alemanha). Este equipamento mede o Rendimento de Fluorescência (F) e o Máximo Rendimento (Fm), gerando assim uma estimativa do rendimento fotossintético das zooxantelas associadas aos corais. Serão avaliados recifes submetidos a diferentes regimes oceanográficos (próximos e afastados da costa), em diferentes profundidades, e em diferentes condições (branqueados, doentes e saudáveis).

O estudo também irá identificar bioindicadores de impactos ambientais em corais e análises de concentração de metais nestes organismos. Será realizado o monitoramento da comunidade microbiana total associada aos corais (muco dos corais e coluna d'água adjacente), que poderá apontar a presença de sedimentos e/ou de impactos presentes nas diferentes áreas amostradas e que poderiam ser rastreados em áreas adjacentes.

O monitoramento dos fundos recifais (percentual de cobertura por organismos bentônicos, corais e algas, estado de saúde, densidade de recrutas de corais, eficiência fotossintética, etc.), será realizado trimestralmente, permitindo melhor acompanhamento da dinâmica de vida de tais organismos e suas respostas às forças em atuação na região.

Será realizada a caracterização e comparação genética e ecotoxicológica entre os organismos alvos do monitoramento. Esta comparação visa quantificar ou qualificar o impacto entre os organismos das regiões próximas à foz do rio Doce daqueles presentes em fundos recifais da APA Costa das Algas e do RVS de Santa Cruz, considerando a conectividade oceanográfica e o comportamento de populações de espécies marinhas como metapopulações. Para a APA Costa das Algas e RVS de Santa Cruz, a malha de amostragem segue o descrito no TR4.

A eventual associação do estado de saúde dos corais e dos resultados da comparação genética e ecotoxicológica entre os organismos alvos do monitoramento com o rompimento da barragem é alvo de questionamento no item 4 deste documento.

4.5 Anexo 4 - Monitoramento de potenciais impactos do rejeito de minério de ferro na praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce

Este anexo tem como objetivo geral avaliar a balneabilidade das praias para uso recreativo e as condições ambientais dos ecossistemas, a distribuição espacial e a magnitude dos impactos e as consequências sobre as atividades ecológicas e econômicas do litoral. Parte-se da premissa que as praias foram contaminadas pelos rejeitos liberados após o rompimento da Barragem de Fundão.

4.5.1 Objetivos

São objetivos específicos deste estudo:

- Determinar o alcance máximo dos contaminantes ao longo da costa e seu deslocamento ao longo do tempo;
- Identificar os processos morfodinâmicos envolvidos na distribuição dos contaminantes;
- Verificar a possibilidade da contaminação atingir a berma alta da praia e a costa e, em caso afirmativo, em que condições de energia de onda;
- Determinar a resiliência do sistema praia-antepraia para neutralizar a ação dos contaminantes ao longo do tempo nos sedimentos e na fauna bentônica.

4.5.2 Área de Estudo

Conforme definido pelo Anexo 4 do TR4, serão estabelecidas 10 estações de amostragem em praias entre os municípios de Aracruz e São Mateus (ES). São os mesmos pontos definidos para os estudos ecotoxicológicos nas praias adjacentes à foz do rio Doce, apresentados anteriormente no Quadro 3.

4.5.3 Metodologias

Serão realizados levantamentos de perfis topobatimétricos nas praias transversais à costa, com coleta de sedimentos para análises físicas, químicas e biológicas. Dados batimétricos e de sedimentos devem ser investigados até a isóbata de 10 m com auxílio de embarcação e mergulhador, por meio de coleta superficial e testemunhagem.

A análise integrada dos dados irá permitir conhecer a distribuição e alcance dos rejeitos ao longo das praias. Informações sobre o clima de ondas irão permitir desenvolver modelos aplicados na interpretação adequada dos processos envolvidos na distribuição do rejeito, na identificação das áreas de maior concentração de deposição e na discussão da resiliência e adaptação morfodinâmica da praia após incorporação desta fração de material.

- Morfologia e sedimentologia

Caracterização multidecadal do clima de ondas

Para fundamentar a interpretação morfodinâmica de curto prazo e verificar tendências de longo prazo, será realizada uma avaliação multidecadal do clima de ondas com base nas seguintes variáveis estatísticas: altura significativa (H_s (m), período de pico (T_p (s) e direção de pico (θ°). Dados de longo prazo seguirão modelos globais de ondas superficiais já disponíveis, como o *Global Ocean Waves* (REGUERO *et al.*, 2012) e NOAA-WW3 (TOLMAN, 2009). O comportamento do espectro de ondas será extrapolado para águas rasas por meio de modelos numéricos específicos, como SMC-Brasil, Sisbahia ou Delft 3D-WAVE, com resolução de malha adequada à batimetria disponível.

Monitoramento de perfis topobatimétricos

Perfis topobatimétricos serão monitorados ao longo da costa entre as estações de amostragem Aracruz 1 e Doce norte 5, consistindo de cinco perfis ao norte e cinco ao sul da foz do rio Doce. Os perfis serão levantados a partir do limite da pós-praia e devem se estender

para a zona submarina até o limite da antepraia média, ou seja, até a profundidade de fechamento, em torno da isóbata de 10 m.

O levantamento dos perfis de praia será feito por posicionamento espacial e altimétrico em tempo real (GPS RTK) ou outros métodos, como nivelamento topográfico por estação total, nível ou teodolito. Os perfis topográficos serão estendidos para além da zona de arrebentação para subsequente acoplagem com o levantamento de perfis batimétricos.

O levantamento da antepraia será feito com auxílio de *jet ski*, traineira ou lancha e posicionamento por GPS RKT, empregando ecobatimetria de dupla frequência para definir a profundidade e espessura da camada de rejeitos.

A acoplagem do perfil da praia com o da antepraia irá seguir Muehe (2004), que define o transporte da cota altimétrica determinada para o perfil de praia por meio de ajuste à previsão maregráfica (MUEHE *et al.*, 2003) por nivelamento desta cota à profundidade da posição da embarcação, com a colocação de uma mira topográfica ao lado da embarcação.

A determinação do estágio morfodinâmico praiar (SHORT, 1979; WRIGHT & SHORT, 1984) deverá ser utilizada como indicação de sua variabilidade topográfica a partir de observações de altura (Hb) e período da onda (T) na arrebentação e sua comparação com a distância (Dup) e duração (Tup) do espraçamento da onda na face da praia, através da seguinte equação (MUEHE, 1998):

$$\Delta = [(\text{sen} \beta \text{ Dup})/\text{Hb}]/(\text{Tup}/\text{T})$$

A caracterização morfodinâmica da praia e do clima de ondas permitirá avaliar a amplitude de mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (*run up*) ao longo da praia e áreas de desova das tartarugas. Esta análise tem o intuito de determinar a vulnerabilidade das praias quanto à mobilidade e/ou possibilidade de contaminação nas áreas de proteção.

Análise sedimentológica

Ao longo dos perfis topobatimétricos serão abertas trincheiras para obtenção de amostras de três subfeições: berma, face praia e antepraia. Serão utilizados trados na porção emersa e testemunhador na antepraia, com auxílio de mergulhador. Amostras superficiais serão coletadas com draga tipo Van Veen.

Os sedimentos das diferentes camadas identificadas serão analisados quanto à granulometria e composição. Os mesmos sedimentos serão coletados para as análises geoquímicas e de macro/meiofauna.

Análises granulométricas serão feitas por um granulômetro a laser, o que exige preparação prévia das amostras. Elas passarão por lavagem, secagem e quarteamento, com posterior extração e quantificação da matéria orgânica. Os parâmetros estatísticos seguirão Folk & Ward (1957) utilizando o *software* GRADISTAT (BLOTT & PYE, 2001).

As análises composicionais devem determinar teores e composição dos carbonatos, caso abundantes, e determinação dos teores e composição dos metais pesados. Estes devem ser separados da fração leve por separação dessimétrica, seguindo Dias (2004), e a identificação realizada em lupas, seguindo Addad (2001).

Integração morfodinâmica

Com base nos dados morfológicos e sedimentológicos e na análise dos perfis topobatimétricos, será identificado o gradiente topográfico submarino e realizada a comparação com o perfil de equilíbrio teórico. Será também avaliada a distribuição e espessura do rejeito sobre o substrato arenoso e sua atuação na morfodinâmica praial.

A caracterização da morfodinâmica da praia e do clima de ondas permite avaliar a amplitude de mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (*run up*), conforme mencionado anteriormente, a partir dos modelos propostos por Stockdon *et al.* (2006) e Sallenger *et al.* (2002), entre outros.

Novamente, espera-se que o monitoramento permita compreender as alterações morfodinâmicas, a adaptação e resiliência do sistema praial após incorporação, mobilização e redistribuição da fração de rejeitos.

- Monitoramento da Fauna Bentônica

A estrutura da comunidade de invertebrados bentônicos marinhos será monitorada por meio da obtenção de amostras de meiofauna e macrofauna nas praias selecionadas. Serão coletas semestrais nos três primeiros anos. Posteriormente, as coletas ocorrerão em anos intercalados. O intuito é avaliar os eventuais impactos sobre o comportamento da fauna bentônica marinha nas praias arenosas. Destaca-se que o Anexo 4 menciona que algumas áreas nessa região já possuem dados pretéritos que podem ser usados para comparação.

Procedimentos de campo

As coletas semestrais nas 10 estações de amostragem serão realizadas nas faixas de antepraia (infralitoral), praia (mesolitoral) e berma (supralitoral), sempre em maré baixa de sizígia. Em cada faixa das estações, as amostras de macrofauna e meiofauna serão coletadas em triplicatas.

As amostras devem ser coletadas com amostradores cilíndricos (15 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade para a macrofauna e 2 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade para a meiofauna). As amostras da macrofauna são lavadas em campo em malha de 0,5mm, acondicionadas em sacos plásticos etiquetados e fixadas em solução de formalina a 5%, enquanto as de meiofauna são diretamente acondicionadas em frascos plásticos com solução de formalina a 5%. Refratômetro e sonda multiparâmetro devem ser utilizados para registrar dados de salinidade e temperatura da água.

Análise das amostras e tratamento dos dados

Em laboratório, a macrofauna será triada manualmente. Os organismos encontrados serão identificados sob microscópio estereoscópico e óptico, com auxílio de bibliografia especializada (p.ex., chaves de identificação). As amostras de meiofauna são lavadas em peneira de 0,063mm, os organismos extraídos por meio de solução açucarada com gravidade específica de 1,14 e montadas lâminas semi-permanentes para sua quantificação e identificação em grandes grupos. A nematofauna será identificada, sob microscópio óptico, até a categoria de gênero.

Os parâmetros densidade, riqueza (número de espécies), diversidade de Shannon-Wiener ($H' \log_2$) e densidade dos organismos mais abundantes são selecionados como descritores univariados da fauna bentônica. Para testar a significância destes descritores univariados, aplicam-se análises de variância (ANOVA). Para as estatísticas multivariadas, podem ser usadas análises de ordenação (MDS), variância permutacional (PERMANOVA) e classificação (SIMPER) (CLARKE & AINSWORTH, 1993; CLARKE & WARWICK, 1994; ANDERSON *et al.*, 2008). As análises estatísticas devem ser realizadas em *softwares* apropriados, como STATISTICA e PRIMER, entre outros.

- Monitoramento da qualidade química das areias

A faixa de praia mais utilizada pela população é a berma, onde geralmente também ocorre a desova de tartarugas marinhas. A praia é majoritariamente constituída por areia, o que justifica, segundo o Anexo 4, analisar a presença de elementos-traço por espectrometria atômica na areia das praias e avaliar o eventual impacto causado pelo rejeito neste local. Para esta análise, as coletas devem ser concomitantes ao estudo morfo-sedimentológico.

Pré-tratamento das amostras

As amostras são secas a 60°C, moídas, homogeneizadas e peneiradas para obtenção de uma fração representativa para análise química.

Fração Biodisponível: para extração desta fração, segue-se a norma ASTM D3974–09 (ASTM, 2015). Uma massa de amostra seca é pesada, transferida para um recipiente de polipropileno e adicionados 100 mL de HCl 2,5% m/v. Esta amostra é então submetida a agitador mecânico por 16 h a 25°C. O extrato obtido após filtração deve ser analisado por equipamentos ICP OES.

Fração Total: o procedimento de decomposição das amostras será adaptado da norma EPA SW-846-3051 (EPA, 2007), que determina a digestão pseudo-total de amostras de solos e sedimentos pelo uso de radiação micro-ondas para aquecimento e diferentes combinações de reagentes. A amostra deverá ter em torno de 0,25 g. Após decomposição, as soluções amostrais são filtradas, avolumadas até completarem 25 mL e armazenadas em local adequado até as análises de espectrometria atômica.

Análise das amostras e tratamento dos dados

O Anexo 4 define que a determinação da presença e concentração dos metais será realizada em equipamentos ICP OES, modelo Optima 7000DV (PerkinElmer®), ICP-MS NexIon 300D (PerkinElmer®) e AAS (Analytik Jena®), seguindo as condições operacionais descritas em Sousa (2015). A Fundação Renova irá verificar se estas mesmas análises podem ser feitas em equipamentos distintos aos descritos no anexo, caso necessário, sem que haja prejuízo à confiabilidade dos resultados.

Estudos de correlação e análise exploratória dos dados serão usados para avaliação dos resultados, conforme princípios da Quimiometria, aplicando-se testes de Análise por Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Clusters (HCA). Os dados podem ser tratados nos *softwares* Microsoft Excel e Matlab MINITAB, versão 16 (segundo JURADO, 2005; WOLD, 1987), ou outros com a mesma finalidade, se necessário e sem prejuízo aos resultados.

Destaca-se que estas análises e interpretações devem integrar os dados de morfodinâmica da praia, sedimentologia das areias, geoquímica dos sedimentos e composição bentônica.

4.5.4 Periodicidade

Nos cinco anos de monitoramentos definidos pelo TR4, as amostras se distribuem da seguinte forma:

- nos três primeiros anos, campanhas trimestrais para análises físicas e geoquímicas e semestrais para análise da macro e meiofauna;
- no quarto e quinto anos, campanhas anuais.

O Anexo 4 ressalta, porém, que a periodicidade e abrangência geográfica das campanhas podem ser alteradas conforme geração e interpretação dos resultados. Por isso, é prevista a realização de uma campanha em caso de tempestade excepcional, pois isto poderá remobilizar sedimentos da plataforma e antepraia e depositar contaminantes na berma da praia, dunas e terraços arenosos por transposição das ondas.

4.5.5 Produtos

O Anexo 4 do TR4 define que o cronograma e o planejamento logístico das coletas sejam apresentados ao ICMBio em até 15 dias antes da primeira coleta. Esta exigência será seguida para todos os anexos, conforme explicitado no item de Premissas deste documento.

É prevista a entrega de relatórios semestrais, também para todos os anexos, em conformidade com o item de Premissas deste documento. Estes relatórios irão contemplar a metodologia utilizada, resultados e discussões, análise integrada abrangendo todos os componentes monitorados e, sempre que os dados permitirem, proposição de ações e medidas de recuperação, avaliação da necessidade de ajustes metodológicos e sugestões.

A base de dados do monitoramento, incluindo as planilhas eletrônicas com os dados brutos e imagens em formato digital, serão entregues junto aos relatórios semestrais.

4.6 Anexo 5 - Alterações ecológicas na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce

O estudo deste item busca avaliar as áreas de manguezal para verificar alterações ecológicas que estes ecossistemas possam ter sofrido em decorrência do rompimento da Barragem de Fundão.

4.6.1 Metodologia

Conforme solicitado, o trabalho será dividido em: 1) Avaliação e monitoramento dos impactos na flora do rio Doce; 2) Estrutura dos manguezais de São Mateus, Barra Nova, Barra Seca, Barra do Riacho, Piraquê-açu e mirim e manguezais de franja do RVS de Santa Cruz - Aracruz; 3) Diagnóstico dos impactos sobre a fauna do manguezal, compartimento caranguejos; 4) Diagnóstico de contaminação da vegetação do manguezal por metais; 5) Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê e 6) Avaliação da estrutura da formação arbustivo-herbácea das Restingas.

- Avaliação e monitoramento dos impactos na flora do rio Doce. Monitoramento da fitossociologia da vegetação paludal na foz do Rio Doce.

Definição da atual estrutura e descrição das espécies halófitas facultativas. Acompanhamento do desenvolvimento em biomassa das espécies arbustivas e arbóreas.

Serão realizadas saídas de campo para estimar a fitossociologia da vegetação paludal e halófitas facultativas que irão compor a comunidade vegetal nas margens situadas na foz do rio Doce. Para tanto, serão realizadas cinco parcelas fixas com dimensões variáveis, de acordo com a estrutura da vegetação. O Anexo 5 define que as parcelas terão sua delimitação definida geograficamente com emprego de RTK (Trimble R4Base), que permite a obtenção de dados de latitude e longitude em tempo real e precisão de milímetros.

Serão obtidos dados da estrutura da comunidade, como diâmetro e altura das árvores e arbustos. Para isto, serão empregados trenas calibradas e telêmetro (TOGNELLA DE ROSA, 2000). Os dados de biomassa serão coletados em áreas pré-definidas e levadas ao laboratório para tomada de peso seco, por espécie (CUNHA *et al.* 2006). Espécimes arbóreos serão marcados com lacre numerado para que as parcelas fixas sejam monitoradas anualmente ao longo de cinco anos.

Os dados obtidos em campo serão avaliados quanto à densidade, composição, biomassa, abundância e índice de importância da espécie em cada parcela. Estes parâmetros serão acompanhados nas avaliações anuais e tratados estatisticamente, de acordo com métodos não-paramétricos (ZAR, 1996), para avaliar e comparar se estão acontecendo modificações significativas na estrutura da comunidade.

Para efeitos de identificação dos impactos relacionáveis aos sedimentos depositados e de origem do dano provocado pelo rompimento da barragem, deve-se coletar sedimentos em cada parcela, anualmente, para que sejam avaliados o grau de contaminação de metais, análise granulométrica e teor de matéria orgânica, entre outros parâmetros. A metodologia de coleta e de análise destes parâmetros seguirá a descrita no Anexo 3.

Determinação da produção primária por meio de técnica de assimilação de carbono. Estimativa dos dados de fotossíntese, da concentração dos pigmentos fotossintéticos, da respiração e de uso efetivo da água.

Na comunidade vegetal de *Talipariti pernambucensi* (hibisco-do-mangue) serão obtidos parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em folhas de segundo par das espécies de porte arbóreo dentro das parcelas fixas, sendo selecionados três indivíduos por espécie. As folhas deverão ser selecionadas entre aquelas avaliadas como intactas e completamente expandidas ($n = 6$). A fluorescência será obtida utilizando fluorômetro portátil e trocas gasosas empregando o sistema portátil ADC. As folhas serão coletadas para análise posterior de pigmentos fotossintéticos.

O monitoramento dos parâmetros que vão identificar a produção primária da vegetação e que podem indicar tensores sobre o desenvolvimento da comunidade serão obtidos nas estações de seca e de chuva ao longo de cinco anos. Estes dados serão analisados empregando-se técnicas de estatística básica (média, desvio padrão), análises paramétricas (ANOVA e teste de Student) para comparação da variabilidade dos resultados e das médias obtidas por amostra e análises não-paramétricas (Kruskal-Wallis, ACP).

A concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofilas a e b e pigmentos carotenoides) será obtida conforme descrito em Pascoalini (2014). Folhas maduras e intactas do segundo par serão coletadas ao acaso, representando os diferentes níveis do bosque, até se obter 30 amostras. Em laboratório, será obtido peso fresco e seco, comprimento, largura e área foliar específica. A concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila e carotenoides) seguirá o descrito em Pascoalini (2014) e Santana (2014).

Serão realizadas análises em HPLC (Waters) e comparadas com aquelas obtidas em campo para avaliação do índice de clorofila por método não invasivo. Em campo, serão obtidos índices de área foliar (IAF) para determinar a cobertura do dossel ao longo do período de monitoramento. Estes parâmetros de IAF devem ser obtidos trimestralmente. O tratamento estatístico será similar ao descrito para as variáveis de fotossíntese.

O acompanhamento desta etapa consistirá na avaliação da pressão que possa ocorrer sobre esta comunidade vegetal em decorrência dos sedimentos contaminados, do grau de contaminação (tipo e concentração), da frequência e intensidade dos distúrbios. A avaliação em longo prazo da produção primária da comunidade vegetal permitirá eliminar o efeito ambiental sobre a variabilidade de produção e aferir o comprometimento causado pelos contaminantes. Para melhor qualificar esta etapa, procedimentos similares de análise de produtividade primária serão desenvolvidos na comunidade de *Talipariti pernambucensis* que ocorre no rio Itaúnas para efeitos de controle e eliminação da variabilidade resultante das influências climáticas.

Estrutura dos Manguezais de São Mateus, Barra Nova, Barra Seca, Barra do Riacho, Piraquê-açu e mirim e do RVS de Santa Cruz - Aracruz. Acompanhamento de dados pretéritos.

A análise da estrutura da vegetação seguirá a metodologia proposta por Schaeffer-Novelli & Cintrón (1986), sendo adotado o método de parcelas (três parcelas contíguas em cada local de estudo). O tamanho da parcela irá variar conforme o número de indivíduos, sendo considerado um mínimo de 30. Os parâmetros coletados serão a altura e o diâmetro à altura do peito (DAP) ou igual a 1,30 m. Em laboratório, serão calculados os parâmetros de área basal, diâmetro e altura média e densidade e dominância relativa das espécies no bosque. Desta forma, serão avaliadas florestas de franja e de bacia e dentro de cada parcela cinco árvores, caracterizando a distribuição de frequência dos diâmetros de todas as árvores que ocorrem na amostra, tendo seu incremento em diâmetro monitorados pela utilização de dendrômetros.

As parcelas fixas serão realizadas em locais onde já existem dados pretéritos de análise da estrutura das florestas de mangue nos rios São Mateus, Mariricu, Córrego de Barra Nova, Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim e também nos manguezais da foz do rio Riacho e nos manguezais de franja do RVS de Santa Cruz.

Em cada rio serão instaladas parcelas na foz, na parte intermediária do estuário e na sua porção superior. Dessa forma, serão três regiões de amostragem com parcelas definidas para as florestas de franja e bacia, totalizando 12 parcelas por rio. No caso do RVS de Santa Cruz, as parcelas serão somente no bosque de franja, tendo em vista a estrutura mais simplificada deste manguezal confrontante ao mar, sobre o laterito costeiro. Cada parcela será georreferenciada com emprego de RTK, Marca Trimble modelo R4Base, que tem precisão de 3,5 mm de erro horizontal, permitindo com isto controle inclusive sobre o ingresso de novos indivíduos em longo prazo.

A classificação da vegetação será feita por comparação tabular, seguindo a escala mista de avaliação do valor combinado da abundância-dominância de Braun-Blanquet, descrita abaixo:

- a) r: indivíduos raros ou isolados;
- b) +: indivíduos pouco abundantes, ou de recobrimento muito fraco;
- c) I: indivíduos abundantes, mas de fraco recobrimento (até 1/20 da superfície);
- d) II: indivíduos abundantes cobrindo de 1/20 a 1/4 da superfície;

- e) III: indivíduos em qualquer número, cobrindo de 1/4 a 1/2 da superfície;
- f) IV: indivíduos em qualquer número, cobrindo de 1/2 a 3/4 da superfície;
- g) V: indivíduos em qualquer número, cobrindo mais de 3/4 da superfície.

As parcelas serão monitoradas anualmente para avaliar a qualidade do bosque. Nestas oportunidades será quantificado o número de plântulas que ingressou na parcela e monitorados os dendrômetros instalados nas árvores.

*Diagnóstico dos impactos sobre a fauna do manguezal, compartimento caranguejos. Avaliação da estrutura populacional dos decápodes da espécie *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos rios Piraquê (Açú e Mirim), rio Riacho, Barra Seca, Mariricu e São Mateus e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz.*

Serão delimitadas 12 parcelas fixas de 25 m², delimitadas com trena de 50 m e marcadas nos seus extremos com lacres, georreferenciadas e fotografadas. As parcelas serão situadas no estuário inferior, médio e superior para bosques de franja e bacia, localizadas contíguas às parcelas fixas para que não haja interferência entre os dois estudos por excesso de manipulação da área amostral. No manguezal de franja do RVS de Santa Cruz serão apenas quatro parcelas no bosque situado sobre o laterito costeiro.

Nas parcelas serão realizadas as seguintes atividades em frequência bimestral: contagem das tocas, diferenciando-as em abertas e fechadas (mortos e em muda), comprimento e largura das tocas e densidade de machos e fêmeas. A metodologia de amostragem será baseada em Branco (1993). No manguezal de franja do RVS de Santa Cruz, a metodologia será adaptada para avaliar as espécies que utilizam a área. Os dados serão trabalhados em laboratório para produzir os seguintes resultados: densidade/m² por espécie, tamanho médio da população por espécie, proporção entre machos e fêmeas e densidade de indivíduos mortos.

Duas vezes ao ano (inverno e verão) serão coletados aleatoriamente ao longo dos estuários 100 exemplares de caranguejos e guaiamuns para aferição da estrutura da população e para que estes dados sejam comparados aos dados de estrutura obtidos por técnica indireta

de avaliação, reportada acima. Estes exemplares serão coletados por catadores profissionais e terão seu comprimento e largura aferidos por meio de paquímetro digital. Cada exemplar terá seu sexo e condição de vida anotado para determinação da razão sexual e para avaliação do período de reprodução.

Os rios Piraquê-Açú e Piraquê-Mirim terão suas parcelas definidas em áreas onde já ocorrem levantamentos sobre a estrutura das populações de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii*, visando utilizar dados pretéritos para diagnóstico do impacto atual sobre a estrutura da população da espécie nesta bacia hidrográfica.

Para os manguezais de franja do RVS de Santa Cruz, as parcelas serão definidas de acordo com as características morfológicas do substrato e densidade de plantas, tendo em vista a carência de dados publicados de caracterização deste bosque.

Anualmente, 10 fêmeas ovadas serão capturadas aleatoriamente nas parcelas para que seja realizado a contagem do número de ovos. As fêmeas deverão ser transportadas para o laboratório, onde os ovos serão retirados dos pleiópodos para determinação da densidade, empregando-se lupa estereoscópica e câmara clara.

Após estas análises preliminares, será realizado tratamento estatístico empregando-se o programa Statistica (StaSoft) ou similar para avaliar os dados médios obtidos, diferenciados quanto aos parâmetros obtidos para fêmeas e machos por parcela, por bosque e por área de distribuição no estuário. Estas médias deverão ser comparadas aplicando-se o Teste de Tukey e realizadas análises de *cluster* para se avaliar o grau de similaridade entre os bosques e em relação a sua distribuição no estuário (ZAR, 1996).

Pelo menos cinco indivíduos de *Ucides cordatus* e cinco de *Cardisoma guahumii* em cada ponto de amostragem deve ser coletado para análises ecotoxicológicas (sendo obtidos músculo, brânquias e hepatopâncreas), sendo que a coleta e conservação das amostras seguirá a metodologia descrita no Anexo 1. Para o manguezal de franja do RVS de Santa Cruz serão coletados indivíduos das espécies de decápodes dominantes na região, considerando a carência

de informações publicadas que possam permitir uma definição prévia das espécies-alvo, para análises ecotoxicológicas.

Para avaliação da distribuição geográfica será identificada e caracterizada a extensão atual das áreas de ocorrência da espécie e suas populações, o grau de fragmentação e a qualidade do habitat, além de identificar, para cada área de ocorrência, as tendências de ampliação ou redução de áreas, a origem de tais tendências e a geração de mapa, em *shape file*, contendo a área de ocorrência de cada população e geral da espécie.

Uma ampla revisão bibliográfica será realizada em busca de informações sobre a história de vida e ecologia das espécies. Serão abordadas informações sobre biologia das espécies, incluindo longevidade, biologia reprodutiva, fecundidade, habilidade de dispersão, área de uso, nível trófico e uso de habitat, taxas de natalidade, mortalidade e recrutamento e área de vida. Estas informações serão utilizadas para identificar as lacunas de conhecimento relevantes para a caracterização das espécies, os parâmetros ambientais associados ao período reprodutivo (andada) das duas espécies e o seu respectivo índice de associação. Isto permitirá identificar as ameaças antropogênicas à conservação das espécies (captura de indivíduos para consumo, introdução de espécies competidoras, lançamento de poluentes e ocupação de habitat, etc.) e naturais (ocorrência de hibridização, presença de parasitas ou patógenos, ocorrência da doença do caranguejo letárgico e a presença de espécies competidoras).

Diagnóstico de contaminação da vegetação do manguezal por metais

Os parâmetros a serem analisados e monitorados na vegetação de manguezal serão a concentração de metais (Arsênio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Ferro, Manganês, Mercúrio e Zinco) total e especiação química, concentração dos metais no sedimento superficial e também na água intersticial, realizando testemunhos de, no mínimo, 30 cm de profundidade. A análise destes metais na vegetação dos manguezais será efetuada nas raízes e folhas das espécies ocorrentes em cada bosque, visando avaliar a acumulação destes elementos ao longo dos diferentes estratos do bosque e compará-la com as condições de concentração de metais encontrada no sedimento e na água intersticial.

Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê

São propostas campanhas com ADCP para determinação da forma de inundação dos estuários e do tipo de estuário em termos de determinação da estrutura salina da coluna d'água, bem como da temperatura e outros parâmetros físico-químicos, para avaliar a capacidade de dispersão dos propágulos ao longo do sistema estuarino e de sua relação com os manguezais de franja do RVS de Santa Cruz. Embarcações da comunidade pesqueira local seriam contratadas para a realização destas campanhas de diagnóstico do tipo de estuário. Será realizada uma integração dessa linha com a metodologia de oceanografia física descrita no Anexo 3.

Avaliação da estrutura da formação arbustivo-herbácea das Restingas

Serão realizados inventários da estrutura da formação arbustivo-herbácea pelo método das parcelas, sendo alocadas três parcelas de dimensões 10 x 10 m (100 m² por parcela). Serão amostradas áreas com diferentes fitofisionomias e as parcelas alocadas de forma sistemática (Quadro 12). Para marcação das parcelas, serão utilizadas estacas de madeira e seus limites demarcados com cordões de algodão, sendo todas georreferenciadas.

Quadro 12 - Pontos de amostragem do Anexo 5 do TR4, Monitoramento de Restinga.

Ponto	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	Latitude	Longitude
Ponto1	422753,11	7941055,58
Ponto 2	421264,78	7930512,18
Ponto 3	421059,37	7921271,37
Ponto 4	422243,71	7903323,37
Ponto 5	424314,26	7887331,55
Ponto 6	426718,60	7869476,73
Ponto 7	408104,32	7825340,17
Ponto 8	393191,05	7813435,92

Fonte: Anexo 5, TR4.

Serão medidos o diâmetro do caule na altura do solo e a altura de cada indivíduo. O critério de inclusão na amostragem abrange todos os indivíduos com diâmetro na altura do solo (DAS) igual ou superior a 1,5 cm. Quando os indivíduos apresentarem outras ramificações além do caule principal, deverão ser tomadas as medidas de todas as ramificações para posterior cálculo da área basal. Indivíduos de porte arbóreo danificados por agentes naturais, que apresentarem ramificações saudáveis, deverão ser incluídos na amostragem. Os indivíduos mortos serão contabilizados.

Serão apresentados os parâmetros fitossociológicos (área Basal - AB, densidade relativa - DR, dominância relativa - DoR, dominância absoluta - DoA, frequência relativa - FR, frequência absoluta - FA, valor de importância - IVI e valor de cobertura) para avaliação da estrutura da vegetação. Os dados obtidos nos inventários serão organizados em tabelas e feita a classificação das classes de diâmetro em ordem crescente.

Para avaliação dos impactos serão obtidos parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em folhas que deverão ser coletadas das espécies dentro das parcelas fixas, sendo selecionados três indivíduos por espécie. Estas folhas deverão estar intactas e completamente expandidas. Também deverão ser obtidas as concentrações de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b).

Será coletado sedimento em cada uma das parcelas lançadas para que sejam realizadas as análises granulométrica, química de rotina e matéria orgânica e análise de material foliar, para que sejam medidas as concentrações dos metais. Estas coletas serão realizadas em regime trimestral no primeiro ano e posteriormente em regime anual.

Todos os dados que serão obtidos dos levantamentos em campo e em laboratório serão apresentados em seu formato bruto e processado.

4.7 Anexo 6 - Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio Doce, Plataforma Continental e áreas protegidas adjacentes

De acordo com o apresentado no Anexo 6 do TR4, a região ao redor da foz do rio Doce e plataforma continental adjacente é uma área importante para desova, reprodução e alimentação de diversas espécies ameaçadas de extinção, sobretudo o boto-cinza (*Sotalia guianensis*), a toninha (*Pontoporia blainvillei*), a baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*), a tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), a tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*), a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) e aves marinhas, como o rabo-de-palha-de-bico-vermelho (*Phaethon aethereus*), o rabo-de-palha-de-bico-laranja (*Phaethon lepturus*), o trinta-réis-de-bico-vermelho (*Sterna hirundinacea*), o tesourão-pequeno (*Fregata ariel*), o tesourão-grande (*Fregata minor*), o petrel-de-trindade (*Pterodroma arminjoniana*) e o albatroz-de-bico-amarelo (*Thalassarche chlororhynchos*) (MMA, 2014).

O Anexo também argumenta que os vertebrados marinhos podem ainda ser utilizados como indicadores do ambiente e o monitoramento dos encalhes de cetáceos, aves e quelônios, bem como a coleta e estudo sistemático de tecidos para análises genéticas, de contaminantes e de hábitos alimentares é de fundamental importância para avaliar a saúde das populações que ocupam os diversos habitats atingidos pelos impactos do acidente na região costeira.

Dessa forma, o entendimento dos padrões de uso e deslocamento dessas espécies em áreas possivelmente impactadas ao redor da foz do rio Doce seria importante para a aplicação de ações mitigadoras, caso sejam detectadas ameaças a essas espécies em áreas com maior grau de impacto.

4.7.1 Objetivos

Objetivo Geral

Compreender os impactos causados pela pluma de rejeitos nas comunidades de megafauna marinha em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do rio Doce e plataforma continental adjacente, incluindo o Parque Nacional Marinho (PARNAM) dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.

- Objetivos específicos

- 1) Avaliar e monitorar, por um período de cinco anos, a distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 2) Determinar e monitorar por um período de cinco anos, associação de tartarugas, aves e mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 3) Monitorar, por um período de cinco anos, os encalhes de todos os cetáceos, tartarugas e aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível *causa mortis*.
- 4) Descrever, por um período de cinco anos, a partir de análises moleculares a prevalência de patógenos das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus* na área de estudo para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações ameaçadas ou biomonitoras.
- 5) Monitorar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de cetáceos e tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo num período de 10 anos.

- 6) Monitorar a evolução das dosagens de contaminantes e histopatologias em tecidos de cetáceos e aves marinhas em encalhes e de aves marinhas vivas na área de estudo num período de cinco anos.
- 7) Descrever, por um período de cinco anos, a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis de *S. guianensis* e *P. blainvillei*, e das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus*.
- 8) Estimar a idade dos cetáceos e quelônios, de sua primeira maturação e analisar a taxa de fecundidade dos cetáceos encontrados mortos nas praias ao longo de cinco anos.
- 9) Avaliar a interação dos pequenos cetáceos com a pesca no litoral do ES: identificar possíveis mudanças durante cinco anos.
- 10) Monitorar as áreas de desova de *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* ao redor da foz do Rio Doce, incluindo o comportamento reprodutivo dessas espécies, distribuição espacial e temporal de ninhos, sucesso reprodutivo e efeito de contaminantes sobre a saúde de fêmeas e filhotes (neonatos).
- 11) Avaliar o efeito da presença de contaminantes provenientes dos rejeitos de mineração ou que foram mobilizados pelo fluxo de rejeitos sobre a saúde das tartarugas marinhas e sua eficiência reprodutiva.

Quanto ao objetivo 5), a Fundação sugere que a duração dos estudos voltados ao seu cumprimento também seja de cinco anos, de forma a se igualar às demais ações propostas e se adequar ao item III da Cláusula 165. Semestralmente serão realizadas avaliações de todos os estudos e poderão ser discutidas as durações de determinados temas para interrupção ou continuidade, a depender das respostas geradas.

4.7.2 Área de Estudo

Todo o litoral do Espírito Santo, incluindo o PARNAM dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.

4.7.3 Metodologias

- Objetivo 1 - Avaliar e monitorar, por um período de cinco anos, a distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz

Censos aéreos com aeronaves tripuladas

O Anexo 6 determina a utilização de censos aéreos com aeronaves tripuladas para avaliação da distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos. Define-se o uso da metodologia descrita por Buckland *et al.* (2001), de amostragem por distância em transectos lineares, que assume que a densidade de animais na área amostrada, retângulo de comprimento igual a extensão da transecção e altura igual a duas vezes a faixa de busca do observador, é, em média, proporcional à densidade de indivíduos em toda a área de estudo, desde que as transecções sejam alocadas de forma a proporcionar uma probabilidade de cobertura uniforme (ou seja, o número de km voados por unidade de área seja constante).

Cada observador varre uma área entre os 90° e os 30° de declinação em relação ao horizonte, empregando maior esforço de observação próximo aos 90°. Em relação ao rumo do avião, o observador não deve buscar grupos após os 90° (considerando o rumo do avião = 0°). Cada observador será também responsável pela coleta das condições ambientais, consideradas possíveis co-variáveis que afetem a probabilidade de detecção, sendo estas informações tomadas no início de cada transecto e a cada vez que ocorrer uma mudança significativa.

As condições ambientais a serem registradas são:

- ✓ estado do mar em escala Beaufort;
- ✓ reflexo no campo de visão, porcentagem e intensidade;
- ✓ transparência da água (registrado visualmente como “turva” ou “clara”);

- ✓ visibilidade, elencada subjetivamente como “excelente”, “boa”, “moderada” e “ruim” de acordo com a escala de Rugh *et al.* (1993).

Essas variáveis podem influenciar a detectabilidade de mamíferos marinhos e serão adicionadas aos modelos de densidade (MARQUES & BUCKLAND, 2003).

Para cada detecção será registrado hora, tamanho do grupo, presença de filhotes e ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo detectado. Os relógios dos observadores serão fixados junto à janela, para facilitar a visualização da hora, e deverão estar perfeitamente sincronizados com o horário do GPS, que será programado para gravar coordenadas a cada 3 segundos. O ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo avistado será coletado pelo observador com o auxílio de um inclinômetro assim que o grupo estiver perpendicular ao observador. Todas as informações serão registradas em gravadores digitais individuais.

O Anexo 6 também determina o tipo de avião que deve ser usado, um Aerocommander 500B, bimotor, com asa alta, janelas-bolha (observadores de frente) ou equivalente. O voo deve ser feito a uma altitude constante de 500 pés e velocidade entre 170 e 190 km/h. O protocolo de coleta de dados deve ser semelhante aos já aplicados por Zerbini *et al.* (2010) e Danilewicz *et al.* (2010, 2012) para a obtenção de abundâncias de toninhas na FMA I, II e III.

Participarão quatro pesquisadores nos sobrevoos, que trabalharão de forma independente, sem comunicação entre eles. O Anexo exige que esta equipe tenha experiência mínima de três monitoramentos aéreos de toninhas, apesar deste monitoramento também envolver tartarugas marinhas e aves. Mesmo com esta experiência, deve ser realizado um voo prévio de treinamento para calibração e padronização. Os pesquisadores se posicionam em pares na frente (janelas-bolha) e atrás (janelas planas).

Dados populacionais das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) obtidos antes da chegada da pluma de rejeitos ao mar devem ser utilizados para comparação quantitativa com os dados que se coletar no âmbito deste monitoramento, permitindo identificar também possíveis locais de afastamento dos animais.

A Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio esclarece que para acompanhamento de tartarugas marinhas, o censo aéreo não é a metodologia mais adequada, mas define que seja feito o registro dos quelônios eventualmente detectados por estes sobrevoos.

Censo embarcado

O Anexo 6 define que a metodologia para contagem das aves marinhas deve ser de censos embarcados mensais, contínuos e instantâneos (TASKER *et al.*, 1984; GOULD & FORSELL, 1989), onde sete transectos (dois ao sul, quatro ao norte e um na foz) perpendiculares à costa, com 200 km de extensão, serão percorridos durante o deslocamento da embarcação, preferencialmente em linha reta, na área monitorada, ao longo das horas de luz do dia.

Cada estação de contagem deverá incluir as seguintes atividades, em ordem de execução: (1) contagem de aves seguidoras na popa da embarcação; (2) tomada de informações sobre variáveis espaciais, temporais e ambientais (data, hora, latitude e longitude, rumo e velocidade da embarcação, profundidade, tipo de atividade desenvolvida pelo barco, estado do mar conforme escala Beaufort, temperatura e salinidade da água, temperatura do ar, direção e intensidade do vento); (3) censo contínuo; e (4) censo instantâneo. Os censos serão realizados por pelo menos um ornitólogo com experiência, sempre do mesmo local ou do melhor lado da embarcação de acordo com condições de luz e vento no momento. Ao final de uma sequência de censo, será iniciada outra após intervalo de 10 minutos. O censo contínuo abrangerá as aves que durante um período fixo de tempo aparecem dentro de uma faixa de 300 m de largura, medida a partir do bordo da embarcação em ângulo reto com a rota do navio, excluindo as aves seguidoras. Aves seguidoras são aquelas que acompanham a embarcação durante a navegação, geralmente voando atrás do barco, e deverão ser contadas da popa. No censo instantâneo, o tempo de contagem será dividido em intervalos consecutivos de duração fixa. Ao início de cada intervalo serão contadas as aves presentes dentro do raio de 300 m entre o rumo do barco e a linha perpendicular a este, varrendo-se assim a quarta parte de um círculo. Os censos contínuos terão duração de 10 minutos e os censos instantâneos terão 10 intervalos consecutivos de 1 minuto.

A posição do limite externo da faixa de censo será determinada segundo Heinemann (1981), através de uma triangulação envolvendo a largura da faixa de censo de 300 m, a altura do observador acima da superfície do mar e a distância entre os olhos do observador e a ponta superior de um paquímetro colocada na linha do horizonte. Para tal, a embarcação navegará a velocidade constante, com rumo conhecido, e com linha do horizonte visível.

Os censos serão realizados por dois ornitólogos com experiência, simultaneamente, para evitar problemas de detecção de aves durante o deslocamento da embarcação (SPEAR *et al.*, 2004). Os ornitólogos serão auxiliados pelo observador de mamíferos. A densidade de aves (número de aves/km²) será calculada com base nos resultados obtidos nos censos instantâneos, com referência à área total coberta em cada censo, sendo esta igual a 10 vezes a área varrida em cada contagem instantânea.

Informações sobre áreas e padrões de forrageamento devem ser coletadas de duas espécies de aves marinhas por meio de rastreamento remoto, cujos transmissores deverão emitir sinais de rádio captados pelos satélites em órbita terrestre que estão sobre a área no momento em que o sinal é emitido (ARGOS, 1996). Os equipamentos deverão pesar até 5 g, serem fixados no dorso das aves marinhas e, dependendo do modelo, recarregados por meio de um painel solar. Os dados devem ser obtidos sem a necessidade de recaptura dos organismos, através de um canal de transmissão de dados alugado junto a empresa especializada (CANDIA-GALLARDO *et al.*, 2010).

Itinerário Fixo

A metodologia de Itinerário Fixo segue Branco *et al.* (2010). Serão estabelecidas quatro trilhas a serem percorridas mensalmente na praia (com auxílio de quadriciclos). Cada trilha terá 30 km de extensão. Duas seguirão ao norte da foz (até Degredo e Barra Seca), outra ao sul da foz (até Barra do Riacho) e uma última mais ao sul (15 km ao norte do Piraquê-açu e 15 km ao sul).

Para registrar a existência de indivíduos de interesse em bancos de areia, utilizados como dormitório e área de descanso, na margem da foz e no estuário, será utilizado o método de Contagem em Descanso (BRANCO *et al.*, 2010).

Esta metodologia deve resultar na apresentação de lista com identificação de espécies, *status* de conservação, guilda trófica, espécies indicadoras, área de vida, padrões de distribuição, abundância, riqueza e biodiversidade.

Bioacústica

Através da interpretação de sinais sonoros (taxa e períodos de emissão das vocalizações e dos sons de ecolocalização) obtidos através de ferramentas de acústica passiva será possível compreender os padrões de uso da área de estudo por cetáceos. Aliado a isso, serão avaliadas as características físico-químicas do ambiente que possuem maior influência sobre os parâmetros de frequência e intensidade de sons modulados e pulsados dos cetáceos sob diferentes escalas de variação espacial na região através de um delineamento amostral hierárquico.

Assim, dados acústicos e comportamentais serão coletados a partir de uma embarcação adequada para a atividade, onde serão realizadas gravações sincrônicas de vídeo e áudio e gravações de áudio independentes. Imagens serão gravadas a partir de uma câmera de vídeo portátil conectada a um hidrofone e um microfone. Gravações de sons independentes serão realizadas com hidrofone e um gravador de estado sólido portátil. Após a avistagem, a aproximação ao grupo de cetáceos será realizada de forma que o grupo de animais não se sintam demasiadamente perturbados ou encurralados pela proximidade do barco. As gravações serão iniciadas após o desligamento completo do motor da embarcação. A distância mínima do grupo para o início dos procedimentos deverá ser de 500 m. Juntamente com as gravações de imagem e som serão coletados dados de caráter ambiental, como temperatura da água, direção do vento, existência de correntes no local da gravação e profundidade.

A composição do grupo, tipo e comportamento serão descritos. Se possível, os animais serão posteriormente identificados por meio das imagens coletadas. Categorias comportamentais serão estabelecidas de acordo com os etogramas empregados para a espécie.

Para assegurar que os sons gravados estão de fato sendo produzidos pelo grupo focal, será utilizado um arranjo de hidrofones de quatro unidades para a determinação do ângulo de origem do som, que será rebocado pela embarcação. A distância dos animais e sua angulação em relação ao azimute da embarcação serão determinadas por um *laser finder* e uma bússola. Se determinado que os animais estiverem muito próximos da embarcação, se apresentarem sinais de *stress* devido a aproximação do barco ou se o grupo iniciar natação constante para longe da embarcação, as observações serão interrompidas e um novo grupo focal será eleito. Para tal, as rotas serão aleatórias, até que os animais sejam encontrados.

A partir da aproximação dos golfinhos, o motor do barco será desligado para que sejam iniciadas as gravações. As gravações serão feitas seguindo o método de Dudzinski *et al.* (1995). As emissões sonoras serão gravadas por meio de um hidrofone C54 (008-100 kHz; -165 dB re 1 V / MPA) implantado em cerca de 2 m de profundidade. Este hidrofone será acoplado a entrada de microfone de um gravador M-Audio MicroTrack 24/96 (96 kHz; 24 bit; arquivos .wav) e sua saída será acoplada à entrada de microfone de uma filmadora digital SONY DCR-SX40 protegida por uma caixa estanque, para que se possa fazer filmagens subaquáticas.

O indivíduo que emitir o sinal vocal deverá ter seu comportamento registrado pela câmera, além da sua vocalização (adaptado de DUDZINSKI *et al.*, 1995). Paralelamente, outro membro da equipe deverá registrar em planilha de campo dados ambientais, tomados a cada hora. Seguindo a técnica de amostragem de grupo-focal (ALTMANN, 1974), informações sobre a composição do grupo, comportamento aéreo dos golfinhos, localização geográfica e tempo de permanência na área serão registrados a intervalos de cinco minutos.

As análises das emissões sonoras serão feitas utilizando o programa Raven Pro 1.3, o qual fornece o oscilograma e o sonograma, e do *software* Adobe Premier 7, que mostrará a gravação da imagem em tempo sincronizado com o oscilograma da trilha sonora gravada, procurando relacionar a vocalização emitida com o comportamento. As emissões sonoras serão

classificadas inicialmente em cliques, sons pulsantes ou assovios. Os assovios serão classificados em tipos, conforme a similaridade de seus contornos.

- Objetivo 2 - Determinar e monitorar por um período de cinco anos, associação de tartarugas, aves e mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz

Pontos fixos

Para as observações em pontos fixos, serão realizadas saídas prévias a campo para se determinar pelo menos dois pontos fixos de observação nos estuários do rio Doce, em Linhares. Como comparativo será realizado um monitoramento também no rio Piraquê-açu em Aracruz ou em outras áreas que os drones identifiquem como áreas principais de uso.

Com o auxílio de binóculos serão realizadas quatro observações mensais, sendo uma por semana, onde o tempo de observação diária será de seis horas por ponto. O período do dia de observação entre os pontos será alternado para evitar repetições de marés.

Quando forem avistados, os indivíduos serão registrados quanto à espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento no momento, localização exata (GPS) e outras informações pertinentes. Estes dados serão inseridos em uma planilha padronizada.

Durante este período serão realizadas observações naturalísticas dos comportamentos utilizando o método de amostragem *Ad Libitum* (LEHNER, 1997). Para as observações, deverão ser realizados os métodos “animal focal”, quando o indivíduo é o foco das observações durante um determinado período, mas não necessariamente o único a ser focalizado pelo período de amostragem, e o de “amostragem sequencial”, quando o foco corresponde a uma sequência de comportamentos de um ou mais indivíduos (LEHNER, 1997).

Os dados serão agrupados em uma planilha Excel. Para os pontos de coleta serão testadas relações entre a presença e tamanho dos grupos e as variáveis nível de maré (alta, média e baixa), tipo de maré (enchente e vazante), variação de maré, mês, estação do ano, *status* comportamental e tempo máximo. Além disso, as relações serão avaliadas para as diferentes áreas.

Para se avaliar o grau de significância dos resultados, serão empregados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) ao nível de 0,05 de significância (ZAR, 1984) do pacote STATISTICA Versão 5®.

Veículos aéreos não-tripulados (VANT ou drones)

Com o objetivo de se coletar registros (imagens e filmes) em diversos pontos do litoral do Espírito Santo utilizando os padrões metodológicos conhecidos de busca e varredura (BEVAN *et al.*, 2016) de organismos foco deste estudo, serão utilizados veículos aéreos não tripulados (VANT ou drones). Segundo o Anexo 6, esta técnica trará informações sobre diversidade e abundância de indivíduos, tamanho, direção e velocidade de deslocamento, ritmo de mergulho, tamanho do grupo, número de juvenis e adultos, comportamentos de alimentação, deslocamento, interações intra e inter-específicas, dentre outros.

Devem ser feitas aferições de equivalência entre o tamanho dos *pixels* registrados nas filmagens e fotos e distância real em diversas altitudes, o que irá permitir a medição e identificação de organismos e de suas estruturas (escudos pré-frontais de tartarugas, por exemplo). Com isso, acredita-se ser possível realizar foto-identificação de tartarugas marinhas a partir da distinção dos escudos cefálicos, como realizado para nadadeiras de mamíferos marinhos (Dunbar *et al.*, 2014).

Serão realizadas campanhas mensais de dois dias de duração ao redor da foz do rio Doce. Outras seis campanhas são propostas ao longo de toda a costa do Espírito Santo quando forem detectadas agregações nos censos aéreos tripulados.

Se forem identificadas agregações ou a relação de determinada espécie com uma área, devem ser conduzidos o mapeamento e identificação dos microhabitats com o auxílio de um ROV (SMOLOWITZ *et al.*, 2015).

As informações georreferenciadas sobre registros de espécies e de micro-habitats, direções e velocidade de deslocamento dos organismos detectados devem ser compiladas em plataforma SIG (Sistema de Informações Geográficas) e submetidas a diversos tipos de algoritmos ecológicos de análise de distribuição espacial, bem como análises visuais e de interpolação e análises estatísticas tradicionais, de forma a definir níveis de abundância das espécies observadas, padrões de associação com habitats e tendências de deslocamento e as variações temporais destes parâmetros.

Aves

A associação das aves marinhas com determinados habitats deve ser determinada pela análise de *Kernel*, onde áreas com agregação significativa de indivíduos ou grupos são determinadas a partir da interpolação de pontos próximos. Os dados que irão alimentar estas análises serão gerados pelos métodos de censo embarcado e rastreamento remoto.

A análise de correlação com características fisiográficas e oceanográficas (batimetria, temperatura superficial do mar, distância da costa, distância de Abrolhos - no caso de aves que se reproduzem nesta ilha, distância da foz do rio Doce e produtividade primária - inferida a partir de clorofila-a), deve ser feita entre estes parâmetros e os dados de abundância.

Os parâmetros podem ser coletados a bordo e em cartas náuticas ou bancos de dados digitais, como o *General Bathymetric Chart of the Ocean* - GEBCO (http://www.bodc.ac.uk/data/online_delivery/gebco/) e o *site* sobre temperatura superficial do mar e produtividade primária (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>).

A correlação entre a distribuição e abundância dos cetáceos e aves e os parâmetros mencionados poderá ser testada por meio de métodos estatísticos tradicionais (e.g. análises de variância, co-variância e canônica), modelos lineares generalizados (GLM) ou modelos aditivos

generalizados (GAM). A variação na composição e abundância (ou taxas de encontro) dos cetáceos e aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas) e por estações do ano deve ser testada por meio de análises de variância (ANOVA).

- Objetivos 3 e 4 (considerados em conjunto):
 - ✓ Objetivo 3 - Monitorar, por um período de cinco anos, os encalhes de todos os cetáceos, tartarugas e aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível *causa mortis*.
 - ✓ Objetivo 4 - Descrever, por um período de cinco anos, a partir de análises moleculares a prevalência de patógenos das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus* na área de estudo para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações ameaçadas ou biomonitoras.

Programa de Monitoramento de Praias

O Projeto de Monitoramento de Praias (PMP) atualmente executado pela PETROBRAS, tem como objetivo geral monitorar diariamente a ocorrência de encalhes de aves, quelônios e mamíferos marinhos, identificando, quando possível, a causa do encalhe. O trabalho é feito nas praias localizadas entre os municípios de Conceição da Barra (ES) e o limite sul do município de Saquarema (RJ), a fim de que possa ser avaliada se há relação entre tais ocorrências e as atividades de exploração e produção de petróleo e gás nas Bacias de Campos e Espírito Santo.

Este objetivo se sobrepõe em parte às exigências do Anexo 6, uma vez que já efetua o registro diário de encalhes de aves, quelônios e mamíferos marinhos vivos ou mortos em toda a linha de praia citada acima, além de registrar as ocorrências reprodutivas de quelônios neste trecho.

Dessa forma, como as equipes da PETROBRAS estarão diariamente no campo registrando tais ocorrências, está sendo firmada parceria para que os registros sejam partilhados, assim como o atendimento e recolhimento de amostras, possibilitando que ambos os projetos

possam executar suas atividades de forma satisfatória. A Fundação Renova já contratou a Fundação Pró-Tamar para realizar o monitoramento de quelônios descrito no Objetivo 10 deste Anexo 6, o que irá auxiliar na notificação e recolhimento de animais encalhados nos 156 km de praias no entorno da foz do rio Doce.

Assim, todas as aves, quelônios e mamíferos encontrados mortos e que estiverem em condições de serem analisadas, serão encaminhados às equipes do PMP para exames necroscópicos na tentativa de se identificar a causa mortis e coleta das amostras descritas no Anexo 1. Já os animais encontrados vivos devem receber atendimento médico visando alta veterinária e, quando possível, a reintrodução no ambiente natural. No entanto, caso venham a óbito após o atendimento, devem ser submetidos a necropsia investigativa da *causa mortis* e coleta de amostras, conforme metodologia descrita no Anexo 1.

Os procedimentos para recolhimento de amostras de análises das amostras coletadas nos animais encalhados também são descritos no Anexo 1 deste Plano de Trabalho.

Aves

Todas as aves que forem manipuladas, tanto nas capturas a bordo quanto no monitoramento de encalhes nas praias, servirão para obtenção de amostras biológicas (sangue e suabes cloacais e de orofaringe) deste estudo em parceria com o PMP - PETROBRAS. A Fundação Renova esclarece que a concretização desta parceria está em negociação com a PETROBRAS, sendo seus termos apresentados posteriormente em documento específico.

A análise das amostras de aves arribadas na região serão subsídio para elaboração de base de dados de avaliação sanitária, parâmetros hematológicos, bioquímicos e microbiológicos das espécies de aves marinhas biomonitoras da condição ambiental e sua evolução. Esta avaliação epidemiológica será essencial para determinar o *status* de saúde das populações e servir como referência para o monitoramento e avaliações futuras dessas aves, além de potencialmente embasar decisões de manejo, contribuindo nas iniciativas de conservação dos táxons ameaçados (KOLENISKOVAS *et al.*, 2012).

Serão realizados exames hematológicos (pesquisa de hemoparasitas, relação H:L), exames bioquímicos e pesquisa molecular de agentes infecciosos, como *Chlamydophila psittaci*, Paramyxovirus-1 e Paramyxovirus-2, Adenovirus, Avipoxvirus e Flavivirus, *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., *Pasteurella* sp. e *Borrelia* sp., entre os principais.

As coletas de sangue serão realizadas por venopunção da veia ulnar ou da jugular. No máximo 1% do peso corporal de sangue de cada ave poderá ser coletado, utilizando agulhas descartáveis acopladas em seringas heparinizadas. Imediatamente após a coleta do sangue, será realizada uma extensão sanguínea e em seguida o sangue será transferido para microtubos (tipo *Eppendorf*), previamente identificados. Após a coleta, os microtubos serão mantidos em caixas refrigeradas e encaminhados ao laboratório para realização das análises. As amostras de sangue total serão processadas para realização dos parâmetros hematológicos e extração de DNA. As amostras de DNA extraídos por kits comerciais, tanto das amostras de sangue quanto das amostras de suabes cloacais e de orofaringe, serão mantidas congeladas a -80°C para posterior utilização nos exames de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético para a identificação do patógeno.

As amostras de cloaca e orofaringe para análise microbiológica e PCR serão coletadas das aves utilizando-se suabes estéreis específicos e mantidas refrigeradas em meio de transporte Stuart por até 48 horas até processamento no laboratório (cultura e isolamento das bactérias). Um segundo suabe de cloaca e orofaringe será processado diretamente para detecção molecular de patógenos, sendo mantidos congelados em tubos tipo *Eppendorf* contendo meio PBS, antibiótico e antifúngico, desde imediatamente após a colheita até análise laboratorial. Estas amostras também serão utilizadas no sequenciamento em massa (metagenômica) para identificação da presença dos patógenos de escolha. A correlação entre a presença e prevalência dos patógenos em aves e variáveis ambientais poderá ser investigada através de métodos estatísticos tradicionais (p.ex., análises de variância, co-variância e canônica) ou alternativamente, utilizando modelos lineares generalizados (GLM) ou modelos aditivos generalizados (GAM). A variação na composição da microbiota e na prevalência de doenças/patógenos de aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas), por estações do ano, deverá ser verificada através de análises de variância (ANOVA).

Cetáceos

Para as análises bacteriológicas, os materiais serão remetidos refrigerados em caixa isotérmica ao laboratório, com meio de transporte adequado para cada análise (PAIVA *et al.*, 2006), imediatamente após o término das colheitas para facilitar o isolamento do agente infeccioso. Para a detecção de vírus as amostras deverão ser mantidas em microtubos de polipropileno e congelados a -20°C até o envio para o laboratório. Em caso de observação de lesão característica de papilomavírus, a verruga deverá ser devidamente retirada e congelada até a chegada ao laboratório.

Os exames sorológicos de bactéria e viral serão centrifugados após a colheita e mantidos congelados até o momento da análise. Para o exame sorológico de toxoplasmose, deverá ser utilizado o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) utilizando taquizoítas inativados pela formalina e 2-mercaptoetanol, conforme descrito por Dubey & Desmonts (1987). Os exames fúngicos para detecção de micoses superficiais, subcutâneas ou oportunistas deverão ser realizados utilizando fragmentos da borda da lesão de pele, e o suabe nasal deverá ser enviado em meio de cultivo para a análise no laboratório.

Os vírus coronavírus e rotavírus deverão ser pesquisados. A detecção do coronavírus deverá ser realizada mediante amostras fecais colhidas com suabe estéril e processadas utilizando uma reação de transcrição reversa, utilizando duas etapas de amplificação. Para a detecção de rotavírus, deverá ser utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) descrita por Herring *et al.* (1982).

As amostras de sangue e suabes deverão ser testadas quanto à presença de agentes infecciosos e parasitários. Para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, deverá ser realizado o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY & DESMONTS, 1987) utilizando amostras de soro. A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* deverá ser feita com o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) devido ao fato deste exame não necessitar de conjugado específico para a espécie animal. O título de 1:20 deverá ser considerado indicativo para uma prévia infecção por *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2003).

A extração de DNA e caracterização molecular para *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., hemoparasitos (*Rickettsia*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. e dos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cythauxzoon*), do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), morbilivírus (Família Paramyxoviridae), herpesvírus, poxvírus, leveduras e *Candida* spp. devem seguir as metodologias descritas no Anexo 6. Raspados de pele e suabes de lesões suspeitas de infecção fúngica deverão ser também coletados.

- Objetivo 5 - Monitorar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de cetáceos e tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo num período de 10 anos (sugerida redução para cinco anos em atendimento ao item III da Cláusula 165).

Para identificação da estrutura genética das populações, amostras de músculo dos cetáceos, tartarugas marinhas (encontradas em áreas de desova) e aves de interesse, encontrados durante o período do estudo, deverão ser avaliados e utilizados como biomonitores. Os resultados levantados deverão ser comparados com os encontrados nas populações em períodos anteriores (REIS *et al.*, 2010; VARGAS *et al.*, 2008; VARGAS *et al.*, 2013; SHAMBLIN *et al.*, 2014). Outras espécies poderão ser incluídas nas análises dependendo do número de amostras encalhadas no período de estudo.

Durante os procedimentos de monitoramento embarcado, aves marinhas poderão ser amostradas através de captura com tarrafas utilizando iscas de atração com peixes e vísceras. Amostragens também poderão ser realizadas em Abrolhos, para coleta de sangue da veia tarsal ou ulnar e comparadas com as amostras de Abrolhos e de Trindade que já foram coletadas em período anterior ao rompimento da barragem.

O armazenamento dos tecidos e posteriores análises genéticas devem seguir as especificações apresentadas no Anexo 6. Este Anexo define a realização de análise das sequências mitocondriais, o cálculo dos componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações. Serão construídas as redes de haplótipos com cálculos de Median Joining no programa Network e feita também a sexagem

molecular dos indivíduos não necropsiados. Para as análises dos microssatélites, os *loci* deverão ser identificados com o *software* GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o *software* Cervus v.3.0.3 (KALINOWSKI *et al.*, 2007). Os genótipos dos indivíduos avaliados deverão ser comparados para os *loci* de microssatélites com o programa Mstools v. 3.1 (PARK, 2001) para se verificar a presença de genótipos idênticos.

O desequilíbrio de ligação entre os *loci* será verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg deverão ser testados por meio do *software* Arlequin v.3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2010). Os *loci* também serão testados quanto a presença de alelos nulos, abandono de alelos e erros devido à presença de picos *stutter* utilizando o programa Microchecker v.2.2.0.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004), com correção de Bonferroni.

Para as análises intrapopulacionais serão calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (GOUDET, 2001) e Arlequin v.3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2010).

Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente, um teste de ocorrência de *Bottleneck* (efeito gargalo) será realizado utilizando o *software* Bottleneck v. 1.2.02 (CORNUET & LUIKART, 1996).

Para determinar a provável estrutura populacional deverá ser realizada uma análise de *cluster* bayesiana para se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos microssatélites e dos locais de coleta, utilizando o *software* Structure v.2.3.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000).

Após a alocação dos indivíduos em cada *cluster*, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também serão calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (F_{ST}) e índices de R_{ST} (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web

(<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Valores de P deverão ser considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Os animais que não forem recolhidos, mas tiverem uma amostra de tecido recolhida na praia, terão o sexo definido via PCR. Os *primers* a serem utilizados deverão ser ZFX0582, ZFX0923 (BÉRUBE & PALSBOELL 1996), PMSRYF (RICHARD *et al.*, 1994) e TtSRYR (ROSEL, 2003). Para a sexagem molecular das espécies de ave que não possuem dimorfismo sexual externo deverá ser usado o gene CHD (FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 1999). As reações de PCR deverão ser confeccionadas com Tampão 10x, 150 μ M de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,3 μ M de cada *primer*, com exceção do *reverse* para o SRY, que deverá ser aplicado 0,06 μ M. O volume final deverá ser de 25 μ L. A amplificação deverá ser realizada nas seguintes condições: 92°C por 30 s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 51°C por 45 s e 72°C por 45 s. Os fragmentos deverão ser separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel *red*. A corrida eletroforética deverá ser realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas deverá ser realizada com o auxílio de luz UV e estas deverão ser fotografadas.

- Objetivo 6 - Monitorar a evolução das dosagens de contaminantes e histopatologias em tecidos de cetáceos e aves marinhas em encalhes e de aves marinhas vivas na área de estudo num período de cinco anos.

Após recolhidas as amostras de tecidos, o material de cetáceos, quelônios e aves será enviado para um laboratório especializado em análises de contaminantes. As metodologias para análise deste material já foram descritas no Anexo 1 deste documento.

Além das metodologias descritas no Anexo 6 para as análises de mercúrio total (HgT), elementos traço, organoclorados, organobromados e HPAs, serão realizadas coletas sanguíneas de cetáceos que encalharem vivos para a análise de contaminantes. As coletas deverão ser realizadas em tubos contendo heparina e EDTA, sendo posteriormente encaminhados para o laboratório. As amostras de soro sanguíneo deverão ser estudadas. A quantificação de Mercúrio (Hg) e Selênio (Se) deverá ser obtida através do Método Calorimétrico - Espectrometria de Absorção Atômica. Para obtenção da concentração sérica de Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro

(Fe), Cobalto (Co), Molibdênio (Mo) e Chumbo (Pb) a técnica adotada deverá ser a Espectrometria de Emissão Atômica (ICP OES). Quanto a determinação de Cálcio (Ca), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Potássio (K) e Cloro (Cl) deverá ser feita pelo analisador automatizado para testes bioquímicos e imunoquímicos (Labmax® 240) seguindo as recomendações sugerida pelo fabricante.

Para detecção de metais pesados, amostras de 1 mL de sangue deverão ser coletadas em tubos contendo ácido nítrico ultrapuro em "36-well hotblock" a aproximadamente 95°C. Peróxido de nitrogênio ultrapuro 30% deverá ser acrescentado em cada amostra de sangue para oxidação da matéria orgânica. A amostra de sangue deverá ser evaporada, secada e dissolvida com água deionizada até um volume de 15 mL de solução. A análise deverá ser realizada através da técnica de espectrofotometria de emissão atômica por ICP-MS. Deverá ser coletado 5 mL de sangue total colhido em frasco contendo EDTA. O exame deverá ser realizado no mesmo dia da coleta através de um contador automático de células sanguíneas. Deverá ser também realizada análise manual através de esfregaço e contagem por Câmara de Neubauer.

A medição da atividade da acetilcolinesterase deverá ser avaliado em amostras de sangue de animais segundo o protocolo proposto por Wilson & Henderson (2007). As amostras deverão ser imediatamente congeladas em ácido nítrico e encaminhadas ao laboratório. O material deverá ser pesado e homogeneizado com quatro vezes o volume de tampão de homogeneização (Tris HCl 50 mM, KCl 0,15M, pH 7,4), utilizando homogeneizador *Tissue-tearor* (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado será centrifugado a 9.000xg por 30 minutos a 4°C. No sobrenadante deverá ser analisada a atividade da enzima acetilcolinesterase. Esta atividade deverá ser determinada pelo método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961) modificado para um leitor de microplacas.

Nas aves marinhas deverão ser analisados os metais/elementos-traço Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As, de amostras de sangue e penas das aves vivas (debilitadas encontradas nas praias, capturadas a bordo das embarcações ou nas ilhas onde se reproduzem). Das aves mortas nas praias da região deverão ser realizadas as mesmas análises de duas espécies costeiras, uma residente, o atobá-marrom (*S. leucogaster*) e o migratório *T. chlororhynchos*. Destas amostras deverão ser realizadas análises de penas, fígado, músculo, rim e ossos. Este material deverá ser

congelado para posterior análise. As análises das concentrações destes elementos deverão ser realizadas no mesmo laboratório onde serão realizadas as análises de metais em água, zooplâncton, invertebrados e peixes na região. Estes últimos grupos da fauna incluem potenciais presas das aves e, desta forma, ao usar-se o mesmo procedimento serão possíveis comparações entre os grupos, para um melhor entendimento da dinâmica dos elementos contaminantes na região.

As amostras de material biológico das aves deverão ser preparadas e analisadas segundo as metodologias descritas no Anexo 6. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, deverão ser realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, deverão ser analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras deverão ser realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, deverão ser utilizadas soluções padrões dos metais analisados (SpecSol®, QuimLab Química & Metrologia, Jacareí, SP), rastreadas ao *National Institute of Standards and Technology* (NIST, Gaithersburg, MD, EUA), para verificar a acurácia das medidas. Por sua vez, a exatidão dos resultados obtidos deverá ser avaliada utilizando-se os seguintes materiais de referência certificados para análise de metais traços: proteína de peixe DORM-4 (NRCC) e tecido de mexilhão ERM-CE278 (European Reference Material). Amostras destes materiais de referência certificados deverão ser tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico coletado.

- Objetivo 7 - Descrever, por um período de cinco anos, a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis de *S. guianensis* e *P. blainvillei*, e das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus*.

Para a análise dos isótopos estáveis $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, deverão ser retiradas alíquotas de músculo dos cetáceos e das suas presas preferenciais na costa do Espírito Santo. Em aves serão coletados músculos das aves mortas nas praias e sangue das aves vivas.

As amostras coletadas serão congeladas, enviadas para análise em laboratório e analisadas segundo as metodologias descritas no Anexo 6. Deverão ser usados materiais certificados de referência em todas as análises.

As análises estatísticas terão enfoque bayesiano (ELLISON, 2004), utilizando o pacote SIAR (*Stable Isotope Analysis in R*) (PARNELL *et al.*, 2010), no qual os modelos de mistura permitem inferir a composição de dieta a partir de várias fontes potenciais de alimento.

- Objetivo 8 - Estimar a idade dos cetáceos e quelônios, de sua primeira maturação e analisar a taxa de fecundidade dos cetáceos encontrados mortos nas praias ao longo de cinco anos.

A determinação da idade dos odontocetos será realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinedo & Hohn (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo serão colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, deverão ser realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, de cerca de 25 micrômetros em um micrótomo de deslizamento acoplado a um sistema de congelamento. Em seguida, os cortes provenientes da porção central do dente serão colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados deverão ser colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lamínula e selados com Entellan. As leituras serão realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas serão coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, deverão ser fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Um fragmento da região central do testículo contendo entre 1 e 3 cm deverá ser emblocado em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos deverão ser seccionados em fatias de 6 micrômetros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções deverão ser coradas com hematoxilina-eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras deverão ser realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade será avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos. Além disso, o diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial também serão avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn *et al.*, 1985). Os ovários serão inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de *corpus luteo* e/ou *corpus albicans*, estruturas essas que indicam a maturidade

sexual. Após inspeção, serão realizadas secções de 3 mm para visualizar o interior do ovário e certificar de que todos os *corpora* e folículos resultantes da ovulação foram registrados. A determinação da maturidade sexual será baseada em Perrin & Donovan (1984), segundo o qual as fêmeas que não apresentarem *corpus luteo* ou *albicans* serão consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais *corpora luteo* ou *albicans* em um ovário serão consideradas maduras.

- Objetivo 9 - Avaliar a interação dos pequenos cetáceos com a pesca no litoral do ES: identificar possíveis mudanças durante cinco anos.

Durante os quatro primeiros anos do projeto, os pesquisadores trabalharão diretamente com as comunidades pesqueiras. Entrevistas e saídas com pescadores serão realizadas e avaliados vestígios de aparato de pesca nos animais encontrados mortos.

Serão escolhidos seis pontos de desembarque em comunidades pesqueiras. Em um primeiro momento, a equipe irá percorrer toda a área de estudo para reconhecimento e contatos com as associações e colônias de pesca, apresentando-se e fazendo um levantamento preliminar, com base nas informações das colônias e associações, do número atual de pescadores e embarcações existentes em cada comunidade.

Após a fase de levantamento preliminar será aplicado um questionário pré-formulado por Félix (2011) para os mestres das embarcações, onde serão coletadas informações acerca do perfil dos pescadores e locais em que atuam, características da embarcação (dimensões, tripulação e autonomia), artefatos e técnicas utilizadas, etc. Embora o questionário seja elaborado de forma a permitir a tabulação e análise dos dados, as entrevistas serão conduzidas de forma informal, através de um diálogo entre os agentes de campo e os mestres das embarcações, podendo este diálogo ser interrompido e retomado em outro momento até que toda a informação necessária seja coletada. Estes diálogos poderão ser gravados ou não, dependendo da anuência do entrevistado e as informações só deverão ser incluídas no estudo com sua autorização.

Nesta etapa, quando autorizado, serão fotografados os tipos de embarcação e petrechos de pesca utilizados.

Nesta primeira fase, as entrevistas terão como foco as atividades de pesca em si, não sendo trabalhada diretamente a questão das capturas, embora este assunto possa surgir de forma espontânea durante a entrevista. As comunidades deverão ser visitadas regularmente.

Ao final, pretende-se ter informações a respeito de avistamentos, ocorrência de capturas acidentais de cetáceos e das características dos artefatos pesqueiros (tipo de rede, malha, etc.).

Os questionários aplicados deverão ser agrupados, de acordo com as respostas obtidas, evidenciando as convergências de informações sobre os diversos temas abordados.

Após os quatro primeiros anos de projeto deverão ser realizados acompanhamentos para se identificar possíveis mudanças a médio e longo prazos.

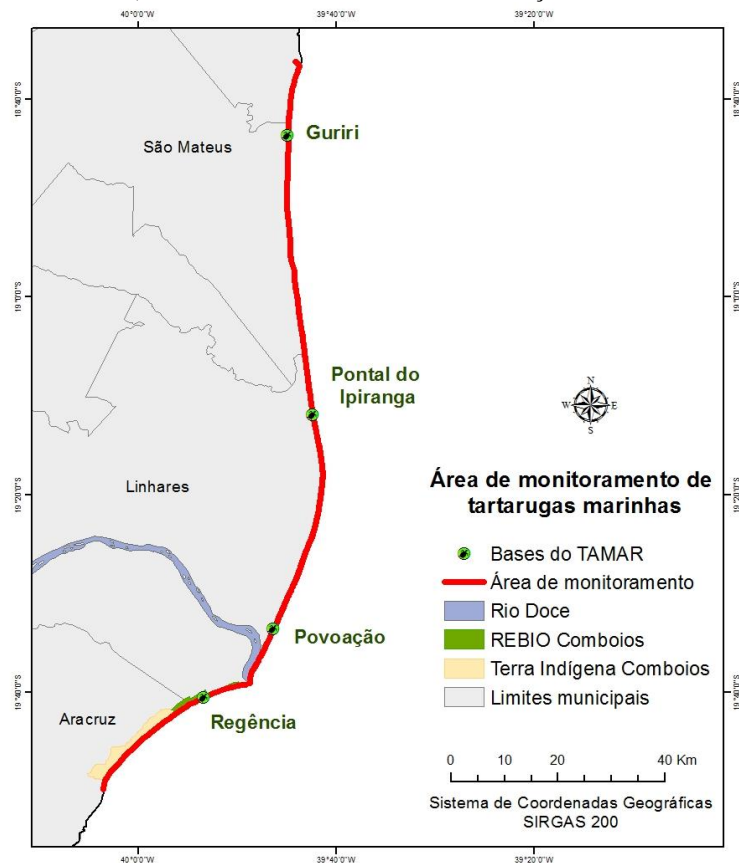
- Objetivo 10 - Monitorar as áreas de desova de *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* ao redor da foz do rio Doce, incluindo o comportamento reprodutivo, distribuição espacial e temporal de ninhos, para avaliar o efeito da presença de contaminantes provenientes dos rejeitos na saúde das tartarugas marinhas e no sucesso reprodutivo.

A execução das atividades previstas neste item do Anexo 6, a partir dos objetivos estabelecidos, é baseada na metodologia padrão do Centro Tamar, que possibilita os estudos de avaliação de localização dos ninhos, identificação das espécies e avaliação do sucesso reprodutivo, entre outros, como meios para avaliar o impacto deste evento, incluindo estudos que avaliem a contaminação dos animais e alterações do habitat que limitem ou impeçam a reprodução destas espécies.

A área de estudo da biologia reprodutiva de quelônios marinhos (monitoramento dos ninhos e das fêmeas) inclui as praias do entorno da foz do rio Doce, 37 km ao sul e 119 km a norte, em um total de 156 km de praias. Esta é a área de reprodução com maior ocorrência de ninhos, por onde se movimentam as fêmeas, e por isso sua relevância para monitoramento.

No trecho sul está localizada a praia de Comboios, incluindo a REBIO de Comboios e a Terra Indígena (TI) de Comboios. Ao norte, situam-se as praias de Povoação, Monsarás, Cacimbas, Ipiranga, Ipiranguinha, Pontal do Ipiranga, Barra Seca/Urussuquara, Campo Grande, Barra Nova e Guriri (Figura 1).

Figura 1 - Área de estudo de biologia reprodutiva de quelônios marinhos (monitoramento dos ninhos e das fêmeas). Fonte: Plano de Trabalho da Fundação Pró-Tamar.



As equipes serão alocadas nas bases do Tamar ao longo da área a ser estudada e serão geridas pelos técnicos do Centro Tamar/ICMBio, conforme metodologia aprovada no SISBIO nº 14122-8.

A execução das atividades previstas nesta proposta irá mobilizar mão-de-obra local, de pescadores e moradores tradicionais da costa, para detecção e monitoramento das fêmeas,

ninhos e filhotes, levando em conta o conhecimento tradicional. Será supervisionado por técnicos e estagiários, de forma que possibilite os estudos de distribuição espacial e temporal dos ninhos, sua proteção, identificação das espécies e avaliação do sucesso reprodutivo, entre outros.

Distribuição dos ninhos e sucesso reprodutivo dos quelônios

Todas as manhãs e ao longo de toda a extensão de praia deverão ser monitorados os ninhos depositados na noite anterior. Os ninhos serão identificados por estacas numeradas e os dados coletados planilha padronizada (localização geográfica por GPS, data, numeração, praia, base, etc, conforme protocolo do Centro Tamar-ICMBio).

Quando necessário, o ninho será protegido contra predadores por telas ou transferido para local mais seguro (por exemplo, quando houver risco de erosão pela maré, desorientação dos filhotes por fotopoluição, predação por animais domésticos ou outras ameaças).

Todos os ninhos serão monitorados até sua eclosão, que varia entre 50 e 70 dias, a fim de garantir os dados reprodutivos. Após eclosão, o ninho será aberto e outros dados coletados, como espécie, número de filhotes nascidos, natimortos, ovos inviáveis e data de eclosão.

Além do monitoramento dos ninhos, ações de proteção dos ovos e filhotes contra predadores e outras ações antrópicas são necessárias para obtenção dos dados reprodutivos e, assim, garantirem o nascimento dos filhotes e a continuidade do ciclo de vida das tartarugas marinhas.

A variação temporal e espacial dos ninhos, taxa de eclosão, tempo de incubação, entre outros, são informações relevantes para a análise de alterações comportamentais e fisiológicas. Estes dados serão comparados com a série histórica de 35 anos de dados do Tamar e com a alteração das características físicas locais, em uma análise integrada com outros estudos de sedimentologia e qualidade da água, entre outros.

Avaliação do comportamento reprodutivo dos quelônios

Este estudo requer o monitoramento noturno das praias para flagrar as fêmeas em processo de desova. Quando encontradas, as fêmeas serão marcadas com anilhas metálicas, ou, se já existentes, será registrado o número da marca. Outros dados também serão coletados, conforme ficha padrão do Centro Tamar, com as informações adicionais necessárias.

Como as fêmeas possuem fidelidade ao sítio de desovas, mas podem variar até 50 km de um ninho a outro, a área de abrangência do monitoramento noturno serão as praias ao sul (37 km) e ao norte (119 km) da foz do rio Doce, totalizando 156 km de praia.

As informações buscadas deverão estabelecer o período e deslocamento internidal, retornos interanuais e locais de preferência para desovas, com acompanhamento de longo prazo das fêmeas. O flagrante da fêmea deverá permitir a coleta de tecido e/ou de sangue para os estudos genéticos e análise de contaminantes.

- Objetivo 11 - Avaliar o efeito da presença de contaminantes provenientes dos rejeitos de mineração ou que foram mobilizados pelo fluxo de rejeitos sobre a saúde das tartarugas marinhas e sua eficiência reprodutiva

Conforme o Anexo 6, este estudo deverá abranger juvenis de *Chelonia mydas*, ovos, filhotes neonatos e fêmeas adultas de *Caretta caretta* e ovos e filhotes neonatos de *Dermochelys coriacea*. Estas espécies, nos respectivos estágios e idades mencionados, utilizam a área de estudo para reprodução ou alimentação.

O estudo deve ser realizado na área de reprodução de *C. caretta* e *D. coriacea* no limite sul da REBIO de Comboios, em Regência, até o limite norte da lagoa Monsarás, em Povoação (ambas localidades de Linhares - ES). Como base para comparação, o monitoramento deve incluir dados coletados em área de reprodução controle da Praia do Forte, BA.

A área de alimentação a ser considerada deve incluir, no mínimo, a zona de amortecimento da APA Costa das Algas a partir da foz do Rio Piraquê-açu. Para fins de

comparação, o monitoramento deve contemplar a região do banco dos Abrolhos no entorno da ilha de Coroa Vermelha, em Nova Viçosa - BA.

O monitoramento da fase reprodutiva deve ser diário ao longo de toda a temporada reprodutiva para amostragem de ovos, filhotes e fêmeas adultas, durando pelo menos cinco temporadas reprodutivas completas ou até quando persistir o efeito dos rejeitos sobre o ambiente marinho. O monitoramento de juvenis de *C. mydas* deve ter periodicidade trimestral e duração mínima de cinco anos ou até quando persistir o efeito dos rejeitos sobre o ambiente marinho.

O estudo deverá avaliar as seguintes questões:

- ✓ Se a presença de contaminantes provenientes dos rejeitos no ambiente ou mobilizados pelo fluxo de rejeitos no organismo das tartarugas juvenis (*C. mydas*) e adultas (*C. caretta*) podem afetar os parâmetros clínico-laboratoriais de saúde da população a curto, médio e longo prazo.
- ✓ Se há transmissão vertical de contaminantes (da fêmea para ovos e filhotes) em *C. caretta* e observar o efeito dos níveis de contaminantes sobre o sucesso de eclosão dos ninhos durante as temporadas reprodutivas enquanto houver influência dos rejeitos sobre o meio marinho. Em razão da dificuldade de obtenção de amostras sanguíneas de *D. coriacea*, estimar o grau de contaminação das fêmeas a partir dos níveis encontrados nos ovos e filhotes, bem como a influência dos níveis detectados sobre o sucesso de eclosão.
- ✓ Avaliar se o impacto sobre o meio afetou ou afetará a abundância das populações estudadas, a disponibilidade de alimento e o *status* nutricional de juvenis de *C. mydas* através de parâmetros clínico-laboratoriais na área afetada a curto, médio e longo prazo.

A avaliação deve ser conduzida por meio de métodos minimamente invasivos, utilizando amostras sanguíneas, ovos e filhotes neonatos vivos ou natimortos. Para a obtenção dos parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e toxicológicos de juvenis e adultos devem ser examinadas ao menos 60 amostras sanguíneas de indivíduos diferentes por temporada reprodutiva, distribuídas ao longo da temporada. Animais recapturados também

devem ter amostras coletadas e analisadas, sem prejuízo para o n mínimo de 60 indivíduos diferentes. Para juvenis, devem ser analisados pelo menos 15 indivíduos por trimestre, totalizando 60 por ano. Juvenis recapturados também devem ter amostras coletadas e analisadas, sem prejuízo para o n mínimo de 15 indivíduos diferentes.

Para ovos e filhotes deverá ser obtido um mínimo de três ovos e filhotes por ninho, que podem ser avaliados individualmente ou em *pool*, totalizando 60 ninhos por temporada para *Caretta caretta* e 45 para *Dermochelys coriacea*.

Em adultos e juvenis os seguintes parâmetros devem ser analisados:

- ✓ Exame clínico realizado por médico veterinário;
- ✓ Hemograma realizado “in loco”;
- ✓ Perfil bioquímico plasmático: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato amino-transferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase;
- ✓ Elementos traço ao nível de partes por bilhão: As, Ni, Cd, Mn, Fe, Cu, Al, Se, Hg, Pb, Zi, Cr, V, Es, Ti;
- ✓ Poluentes orgânicos persistentes ao nível de partes por bilhão: Bifenilas policloradas (PCBs) totais e específicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) totais e específicos, pesticidas organoclorados (OCs) totais e específicos.

Em ovos e natimortos:

- ✓ Elementos traço ao nível de partes por bilhão: As, Ni, Cd, Mn, Fe, Cu, Al, Se, Hg, Pb, Zi, Cr, V, Es, Ti;
- ✓ Poluentes orgânicos persistentes ao nível de partes por bilhão: Bifenilas policloradas (PCBs) totais e específicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) totais e específicos, pesticidas organoclorados (OCs) totais e específicos.

- Periodicidade/intervalos amostrais, produtos gerais e avaliações desejadas

Ao término do Anexo 6 são sumarizadas as periodicidades e intervalos amostrais dos estudos propostos em quadro informativo. As periodicidades/intervalos devem ser seguidas à risca para não prejudicar o planejamento de campanhas e o delineamento amostral previsto. Os quatro produtos gerais previstos serão transformados em capítulos do relatório semestral de atividades previsto no TR4. Estes produtos gerais devem conter as informações solicitadas na seção “Avaliações Desejadas/Produtos” do Anexo 6. Caso estas informações não possam ser fornecidas, devem ser apresentadas as razões para tal e propostas as devidas modificações nas metodologias, periodicidades ou premissas para atendimento adequado ao problema em questão. Estas sugestões podem ser discutidas nos *workshops* semestrais previstos no TR4.

4.8 Anexo 7 - Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha e estuarina

O Anexo 7 tem como premissa a necessidade de monitoramento dos efeitos do rejeito sobre a ictiofauna e carcinofauna das regiões dulcícola, estuarina e costeira adjacente à foz (incluindo áreas recifais). Esta proposta de monitoramento decorre da observação da mortandade causada diretamente pelo impacto, indicando, ainda, outros potenciais impactos sobre esta biota. Entre eles, são destacados a diminuição da abundância e biomassa das espécies, dominância de espécies resilientes, inanição, alterações nos ciclos reprodutivos (época/local de desova), alterações no crescimento e recrutamento, substituição de espécies, mudanças de hábitos alimentares (aparecimento/desaparecimento de itens, diminuição de número de itens ingeridos, quantidade de alimento ingerida) e alterações na saúde.

4.8.1 Objetivos

Considerando que os potenciais efeitos do rejeito descritos acima diminuem ao longo do tempo e do espaço, o objetivo geral deste anexo é monitorar a ictiofauna e carcinofauna, com abordagem espacial e temporal, em relação a três aspectos principais: populações, comunidades, e relação das espécies com o habitat.

As populações serão monitoradas quanto à composição de espécies (ocorrência), abundância, biomassa, tamanho dos indivíduos, alimentação e ecologia trófica (origem do alimento, fontes de carbono, posição no nível trófico), reprodução e recrutamento. As comunidades serão monitoradas quanto à riqueza, dominância e diversidade. Deverão ser monitoradas a utilização dos habitats avaliados pelas espécies selecionadas, por meio de telemetria e microquímica de otólitos, o fluxo de larvas/recrutas e adultos/juvenis de peixes entre o estuário e ambientes recifais adjacentes e os índices de integridade.

4.8.2 Área de Estudo

São propostos 91 pontos de amostragem contemplando as regiões dulcícola, marinha e estuarina, conforme Quadro 13. Segundo o Anexo 7, esta área abrange mais de 130 km, sendo oito pontos no rio Doce e os demais distribuídos ao norte do rio Doce (foz do rio Ipiranga em Urussuquara - ES, rio São Mateus - ES e rio Caravelas - BA, este último na Reserva Extrativista de Cassurubá).

Para os estudos de ecologia trófica, são propostos seis pontos equidistantes 2 km entre si, sendo dois na região interna à foz do rio Doce, um na região adjacente à foz e três pontos na região externa à foz. Para permitir a comparação entre os ambientes, o mesmo desenho amostral é proposto para o estuário do rio Piraquê-Açu.

Quadro 13 - Pontos de amostragem do Anexo 7 - TR4 para monitoramento da ictiofauna e carcinofauna.

Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
Ponto 1	Rio Doce	305077,58	7841603,14
Ponto 2		350963,58	7839489,41
Ponto 3		377966,41	7848097,06
Ponto 4		402950,58	7848549,33
Ponto 5		355728,46	7837501,13
Ponto 6		348718,03	7839780,93
Ponto 7		376785,70	7850610,93
Ponto 8		320335,78	7838805,01
II		407337,87	7772381,14

Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
I2	Recifais	411663,74	7782961,89
I3		391744,43	7787277,00
I4		411675,47	7795169,07
I5		400469,81	7781684,29
LTI-1	Recrutamento	407337,87	7824607,90
LTI-2		411663,74	7827116,61
LTI-3		391744,43	7831277,23
LTI-4		411675,47	7821212,55
LTI-5		400469,81	7824770,89
LTI-6		407337,87	7830006,85
LTI-7		411663,74	7817995,46
LTI-8		391744,43	7820781,19
LTI-9		411675,47	7827306,88
1U	Dieta e rede trófica estuarina	415006,43	7830273,22
2U,C	Estuarino-costeiro	414329,06	7828656,64
3U,C		416400,12	7825016,13
4U	Dieta e rede trófica estuarina	418254,77	7823487,01
5U		419688,59	7825088,34
6U		416306,07	7822093,09
7U		423673,44	7818070,29
8U		427261,81	7827151,81
9U		415382,72	7812452,33
7C	Estuarino-costeiro	423673,36	7818070,29
8C		427261,88	7827151,70
9C		415382,84	7812452,22
SM1		419729,59	7942784,41
SM2		421462,99	7943423,34
SM3		425157,36	7942551,23
SM4	Recifais	427286,31	7941979,87
SM5		427434,80	7943853,90
SM6		426991,40	7939871,21
C1-R1	Recifais	447820,21	7939121,35
C1-R2		455177,06	7937015,80
C1-R3		441812,80	7910334,76
R4		441749,71	7910301,37
C1-R5		442097,40	7910258,19
C1-R6		453782,16	7912448,51
C1-R7		445680,83	7923856,85
LTC1-1	Recrutamento	423650,67	7940046,14
LTC1-2		424377,99	7942826,43

Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
LTC1-3		424184,08	7946466,09
LTC1-4		425518,27	7939931,87
LTC1-5		426013,41	7942799,69
LTC1-6		426177,86	7946628,86
LTC1-7		427575,17	7939961,98
LTC1-8		427838,60	7942806,73
LTC1-9		427824,24	7946579,87
LTC2-1		423650,67	7940046,14
LTC2-2		424377,99	7942826,43
LTC2-3		424184,08	7946466,09
LTC2-4		425518,27	7939931,87
LTC2-5		426013,41	7942799,69
LTC2-6		426177,86	7946628,86
LTC2-7		427575,17	7939961,98
LTC2-8		427838,60	7942806,73
LTC2-9		427824,24	7946579,87
C2-1	Recifais	474116,82	8009056,39
C2-2		471433,92	8012250,08
C2-3		479415,88	8013344,30
C2-4		477337,41	8016107,92
C2-5		485373,35	8018328,24
C2-6		485329,49	8020341,78
C3-1		494710,00	8035127,26
C3-2		498674,36	8034873,47
C3-3		499766,17	8031288,98
C3-4		500720,19	8037550,83
C3-5		500349,25	8042761,65
C3-6		500285,67	8045759,79
C4-1		531838,62	8013672,27
C4-2		531754,70	8014159,21
C4-3		530725,98	8013131,92
C4-4		537834,50	8015111,01
C4-5		537594,21	8011283,40
C4-6		537651,54	8013573,49
PA0,U	Dieta e rede trófica estuarina	375820,22	7793544,25
PA1,U		376858,51	7794813,34
PA2,U		378437,41	7793066,02
PA3,U		382853,89	7793805,00
PA4,U		384973,95	7793562,60
PA5,U		386548,77	7794865,64

Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
PA6,U		384597,91	7791417,55

Fonte: Anexo 7, TR4.

4.8.3 Metodologias e Periodicidade

- Ictiofauna

O Anexo 7 propõe cinco anos de duração para o monitoramento inicial. O primeiro ano será reservado a uma análise diagnóstica de curto prazo com coletas mensais, quando apenas os parâmetros ecológicos (comunidades, populações e relações com hábitat) serão analisados. Conforme os resultados obtidos, serão selecionadas as espécies a serem monitoradas quanto aos parâmetros populacionais (dieta/ecologia trófica, reprodução, recrutamento, bioacumulação e utilização de habitats), a partir do segundo ano de monitoramento.

No segundo ano, as amostragens terão periodicidade trimestral. No terceiro e quarto anos serão semestrais e no quinto ano voltará a ser mensal. O retorno à periodicidade mensal é justificado no Anexo 7 pela necessidade de avaliar a recuperação da ictiofauna e carcinofauna.

Nas áreas recifais, as amostragens serão feitas por censo visual, com periodicidade anual.

Todos os locais de coleta devem ser georreferenciados e todas as espécies registradas devem ser fotografadas, resultando em banco de dados e de imagens fotográficas digitais. O registro fotográfico deve ser feito antes da fixação em formalina para garantir a observação de características típicas de coloração para cada espécie, utilizando-se câmera digital, escala métrica e fundo padronizado.

O Anexo 7 define que as coletas no rio Doce deverão utilizar diferentes artes e petrechos de pesca, como redes de espera, tarrafas, pesca elétrica, redes de arrasto, puçás, peneira ou outros julgados necessários, considerando as características fisiográficas do corpo d'água e as

características biológicas e ecológicas das espécies. O esforço deve ser padronizado para cada petrecho.

Nas áreas estuarinas/costeiras, as coletas devem utilizar redes de arrasto de porta operadas por embarcação camaroeira, visando obter exemplares de espécies de importância comercial.

Todos os indivíduos devem ser identificados ao nível de espécie; eventuais espécies de difícil identificação devem ser encaminhadas a especialistas. Os espécimes serão eutanasiados segundo diretrizes da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os espécimes capturados deverão ter medidos os comprimentos total e padrão (CT e CP, em mm) e o peso (g).

O Anexo 7 define que sejam retiradas amostras de tecidos de todos os espécimes coletados para análises genéticas, mas a Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio esclarece que uma amostra de 30 indivíduos de cada população será utilizada nas análises. As amostras excedentes serão armazenadas para estudos futuros e contraprovas.

Após a coleta, os animais deverão ser fixados em formalina a 10% e etiquetados com informações sobre coordenadas do local de coleta (em UTM, *datum* SIRGAS 2000) e data de captura. Entre 24 e 48 horas depois, os indivíduos serão transferidos para solução de etanol a 70%. As espécies de peixe selecionadas para estudos de alimentação e reprodução, a serem conduzidos a partir do segundo ano de monitoramento, terão removidos os estômagos e gônadas. As espécies selecionadas para os estudos de conectividade, utilizando ferramentas como microquímica de otólitos e isótopos estáveis, e estudos de genética (caso mantidos no escopo), seguirão procedimentos específicos.

Composição e estrutura de comunidades

A composição da ictiofauna será apresentada em tabelas (lista de espécies total e por ponto de amostragem), indicando nome científico, nome popular, número de coleta e pontos de

amostragem onde foram registradas. As espécies serão ainda ser classificadas como raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras e comerciais segundo legislação vigente e bibliografia especializada. A Fundação Renova sugere, ainda, que também sejam indicadas as espécies ameaçadas por sobreexploração.

A curva de rarefação de espécies (curva do coletor) será elaborada por petrecho de coleta, uma vez que é premissa deste teste que os dados utilizados tenham sido coletados da mesma maneira. Os algoritmos de estimativa de riqueza total *Jackknife* 1 e 2, *Chao* 1 e 2, ACE, ICE e *Bootstrap* (COLWELL & CODDINGTON, 1994) deverão ser utilizados para aferição da eficiência de coleta e comparação com a riqueza observada a cada campanha.

Como descritores da comunidade, serão usados os seguintes índices:

- ✓ Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988)
- ✓ Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por meio do estimador *Bootstrap* (MANLY, 1997);
- ✓ Equitabilidade (SMITH & WILSON, 1996);
- ✓ Constância de ocorrência (C) das espécies, determinada com base no percentual e períodos em que cada espécie ocorre;
- ✓ Coeficientes de similaridade/dissimilaridade, como os de Bray-Curtis, Sorensen, Morisita-Horn e Jaccard, para comparação entre localidades e ciclos de monitoramento (MAGURRAN, 1988);
- ✓ Índice de Dominância (McNAUGHTON, 1968).

Análises multivariadas são propostas para verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies (GAUCH JR., 1982; MANLY, 1997) e influência das características ambientais/fisiográficas/geográficas dos pontos de amostragem sobre a distribuição das espécies (MANLY, 1997; TER BRAAK & SMILAUER, 2002).

Serão selecionadas espécies de peixes, de preferência de grande porte e de interesse comercial, para monitoramento por telemetria quanto à utilização do hábitat. Estações acústicas serão utilizadas para detectar transmissores implantados cirurgicamente em exemplares destas

espécies. Espera-se que a telemetria produza dados sobre o processo de recolonização e movimentação das espécies monitoradas na região do rio Doce. O emprego da análise da microquímica de otólitos (razões Ca:Sr) tem como objetivo descrever a utilização de estuários e áreas costeiras adjacentes por indivíduos adultos e juvenis, uma vez que alterações de salinidade causam mudanças nas razões Ca:Sr. Este monitoramento por telemetria e otólitos deverá ocorrer nos dois primeiros anos e no quinto ano.

O comportamento dos ambientes dulcícolas frente ao rompimento da barragem será monitorado por meio de protocolos de Integridade do Hábitat (IIH; Nessimian *et al.*, 2008) e de Avaliação Ambiental (PAA; Callisto *et al.*, 2002). Estes protocolos refletem o nível de preservação ecológica dos ambientes. Nos ambientes estuarinos/marinhos serão descritos índices de integridade biótica utilizando-se populações e comunidades de peixes como indicadores. Segundo Deegan (1997), isso é feito por meio da classificação das espécies de peixes quanto a guildas ecológicas de permanência e uso do estuário (visitantes/residentes; se usam o estuário como berçário; demersais/pelágicas), nível trófico e presença/ausência de anormalidades/doenças. Também será empregada a metodologia adaptada de Sheaves *et al.* (2012), que utiliza a Probabilidade de Encontro (PoE). Esta é a probabilidade de se encontrar determinada espécie em 40 unidades amostrais. Estas metodologias têm como objetivo o acompanhamento de curto e longo prazo na saúde das comunidades de peixes que, por sua vez, refletem as condições ambientais.

Estrutura e dinâmica de populações

Devem ser apresentadas informações prévias ao rompimento disponíveis na literatura científica para espécies de peixes (diagnóstico prévio), contendo, sempre que possível, a estrutura das populações das espécies mais abundantes e das espécies importantes para a pesca. Para as espécies ameaçadas de extinção com ocorrência na Área Ambiental 1 para as quais não for possível a coleta de dados sobre dinâmica da população, deverá ser realizado levantamento bibliográfico detalhando sua biologia.

Deverão ser apresentadas informações sobre relação peso/comprimento, incluindo teste de adequação à hipótese de crescimento isométrico ou alométrico (quando possível analisar

para sexos separados) e de fator de condição relativo e alométrico (quando possível analisar para sexos separados).

Ecologia Trófica

Os estudos de dieta e ecologia trófica, a serem conduzidos com indivíduos das espécies selecionadas após o período de diagnóstico, deverão contar com amostras de músculo para análise da razão dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Os valores destes isótopos representam a origem do alimento e o nível trófico ocupado pelo indivíduo, respectivamente (POST, 2002). As amostras, depois de lavadas com água destilada para remoção de detritos, são acondicionadas em sacos plásticos etiquetados e estes colocados em caixas térmicas com gelo para transporte ao laboratório. As amostras são então conservadas a -20°C e, depois de secas, maceradas manualmente em morteiro de cerâmica.

Para cada amostra é retirada uma alíquota de aproximadamente 0,8 mg, depositada em cápsula de estanho de 5×9 mm. As alíquotas encapsuladas são armazenadas em caixas com nomenclatura alfanumérica e enviadas para análises elementares e de isótopos estáveis (carbono e nitrogênio). As alíquotas são então incineradas em um analisador elementar e os gases resultantes (CO₂ e N₂) transferidos para um espectrômetro de massa de razão isotópica. Os resultados serão apresentados em notação delta (δ) com base em materiais padrão [partes por mil do desvio do material padrão (‰) de nitrogênio atmosférico para nitrogênio e Pee Dee Belemnite carbonato calcário, para carbono] de acordo com a formula:

$$\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{Amostra}}/R_{\text{Padrão}}) - 1] \times 1000$$

Onde:

X é ¹³C ou ¹⁵N e R=¹³C/¹²C ou ¹⁵N/¹⁴N

Além dos músculos de peixes, seus potenciais itens alimentares (moluscos, crustáceos, poliquetas, etc.) e produtores primários da área de estudo também serão coletados para descrever se houve mudanças na estrutura trófica da área estudada logo após o impacto (primeiros 12 meses) e no período subsequente (monitoramento, 24 meses seguintes). As

alterações nas estruturas tróficas (mudança de nível trófico, por exemplo) podem indicar também a remoção ou acréscimo de algum componente na rede trófica, que, segundo o Anexo 7, foram causadas pelo impacto.

Deverão ser analisados os conteúdos estomacais das espécies mais abundantes e de importância para a pesca, por meio de métodos de ocorrência e volumétrico (HYNES, 1950; HYSLOP, 1980). Os percentuais obtidos com esses métodos serão combinados no Índice Alimentar (IAI) de Kawakami & Vazzoler (1980). Conforme o Anexo 7, estas análises também devem ser feitas para exemplares de espécies ameaçadas de extinção que não puderem ser devolvidos ao ambiente.

Biologia Reprodutiva

As espécies mais abundantes e as de importância para a pesca também terão determinados os estádios de desenvolvimento gonadal segundo Vazzoler (1996) e Brito & Bazzoli (2003). A classificação macroscópica de cada estágio das gônadas deve ser complementada por avaliação microscópica de alguns exemplares para validação estatística da primeira.

O tamanho médio em que metade da população apresenta gônadas desenvolvidas, estando apta a reprodução (L50), e o comprimento com o qual todos os indivíduos estão aptos a se reproduzir (L100), por sexos separados, será determinada por meio da análise gonadal descrita acima. Também será determinada a variação temporal da frequência de estádios de maturação gonadal, considerando o ciclo hidrológico completo.

Serão ainda determinados a relação gonadossomática (RGS) de cada indivíduo analisado, o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS, de acordo com a metodologia proposta por Vazzoler (1996). Estes resultados serão apresentados em gráficos.

À semelhança das análises de conteúdo estomacal, o Anexo 7 define que as análises de biologia reprodutiva também devem ser feitas para exemplares de espécies ameaçadas de extinção que não puderem ser devolvidos ao ambiente.

Análise de peixes recifais

As áreas recifais a serem amostradas incluem a Reserva Extrativista (RESEX) de Cassurubá, o Parque Nacional Marinho (PARNAM) dos Abrolhos (estas duas no sul da Bahia) e a Área de Proteção Ambiental (APA) Costa das Algas (ao sul da foz do rio Doce, no Espírito Santo), conforme pode ser visto no Quadro 10. O Anexo 7 define que os pontos de amostragem para o monitoramento de peixes recifais serão classificados segundo sua distância da foz do rio Doce usando-se desenho de impacto Beyond-BACI. Neste desenho, a avaliação é feita semestralmente pela seleção de múltiplas áreas-controle e áreas consideradas impactadas, cuja distância da foz do rio Doce é a menor. Em cada área, seis setores aleatórios são selecionados e seis censos visuais são realizados em cada setor, tendo transectos como unidades amostrais.

Nestas áreas, o recrutamento de peixes é monitorado por censos específicos para juvenis, enquanto o aporte larval na zona recifal é determinado pelo emprego de armadilhas de luz, para estimar a chegada de pós-larvas aos ambientes recifais adjacentes às desembocaduras dos rios.

A abundância e estrutura de tamanho dos peixes serão estimadas e as espécies identificadas por mergulhadores treinados e calibrados para as estimativas de tamanho. A abundância será registrada em classes de abundância na escala logarítmica (base 2) e a estimativa de tamanho de 2 em 2cm. Sugere-se que ao invés de estimativas de tamanho sejam utilizadas classes de tamanho ou classificações etárias, de forma a reduzir discrepâncias relacionadas à experiência dos mergulhadores. Adicionalmente, o Anexo 7 determina a realização de análises genéticas para espécies selecionadas com o intuito de complementar as estimativas de conectividade de habitat (por meio da microquímica de otólito e telemetria), identificar os estoques populacionais existentes para cada espécie e as relações de parentesco entre indivíduos adultos e juvenis, o que permitiria determinar a distância de dispersão larval e a importância das localidades amostradas para a manutenção das populações de peixes, principalmente as ameaçadas.

Genética de populações

O Anexo 7 define que devem ser feitos estudos genéticos com base em marcadores de microssatélites e marcadores populacionais em, no mínimo, 15 espécies mais abundantes de diferentes Famílias, incluindo formas migradoras e não-migradoras, por meio do sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear. Define-se a amostragem de pelo menos 10 *loci* de microssatélites, duas sequências mitocondriais e duas sequências nucleares de 30 indivíduos de cada população, incluindo as seguintes análises:

- ✓ Estimativa da diversidade genética de espécies do rio Doce depositadas em coleções ou bancos genéticos antes da mortandade causada pelo rompimento da barragem;
- ✓ Estimativa anual da diversidade genética das espécies coletadas na Área Ambiental 1 ao longo dos cinco anos do programa de monitoramento;
- ✓ Obter números de frequências alélicas e número de alelos efetivos e privados, o que segundo o Anexo 7 deve ser feito por meio do *software* PopGene v3.3 (RAYMOND & ROUSSET, 1995), e utilizá-los para o cálculo de outras estimativas de variabilidade genética. O mesmo *software* deveria ser utilizado também para os cálculos de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e);
- ✓ Obter estatísticas de composição de nucleotídeos e padrões de substituições inferidos, o que segundo o Anexo 7 deve ser feito por meio do *software* MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013).

A análise de divergência de sequência será inferida pela aplicação do algoritmo Kimura-2-parâmetros (K2P; KIMURA, 1980). Estatísticas de diversidade e polimorfismo de DNA deverão ser aplicadas sobre as sequências dos marcadores para inferência das taxas de diversidade haplotípica - h (NEI, 1987), diversidade nucleotídica - π (NEI, 1987), AMOVA (EXCOFFIER *et al.*, 1992), endogamia e estruturação populacional - ϕ_{ST} (EXCOFFIER *et al.*, 1992) e ocorrência de eventos de gargalo populacional, entre outros, sendo definido para tal os *softwares* ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2010), DNASP 5.4 (ROZAS *et al.*, 2003) e BOTTLENECK (CORNUET & LUIKART, 1996).

DNA Mitochondrial barcoding

O Anexo 7 determina o sequenciamento de segmentos parciais do gene mitocondrial COI para pelo menos cinco indivíduos de todas as espécies coletadas em cada um dos pontos de coleta ao longo do período do monitoramento. Para a amplificação e sequenciamento dos segmentos deverão ser utilizados os primers descritos por Ward *et al.* (2005). As sequências obtidas seriam submetidas ao banco de dados BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) (RATNASINGHAM & HEBER, 2013) para verificar a correspondência e similaridade com as sequências lá armazenadas.

A identificação de *Barcode gap* e o *Barcode Index Number* (RATNASINGHAM & HEBERT, 2013) deverão ser conduzidas por meio do *site* Barcoding of Life (<http://www.barcodeoflife.org/>).

Adicionalmente seria desenvolvida uma biblioteca de DNA *barcodes* para as espécies nativas da região sem sequência registrada. As sequências obtidas devem ser depositadas no banco de dados para reconhecimento formal das sequências *barcode* das espécies em estudo, devendo conter todas as informações descritas no Anexo 7.

Integridade ambiental

A integridade ambiental dos pontos de amostragem deve ser avaliada visualmente, baseando-se em atributos fisionômicos. Serão elaboradas e preenchidas fichas de campo padronizadas para avaliação do *status* dos habitats analisados. Uma dessas fichas será a do Índice de Integridade do Habitat (IIH), conforme Nessimian *et al.* (2008). A ficha para a obtenção desse índice é composta por 12 itens com quatro a seis alternativas para marcação, com pontuação máxima de 1 (mais íntegro) e mínima de 0. Outra ficha baseia-se no Protocolo de Avaliação Ambiental (PAA), conforme Callisto *et al.* (2002). Esta ficha é composta por 22 itens com três a quatro alternativas, sendo a pontuação máxima de 100 e a mínima de 0.

Nos dois índices, as pontuações correspondem ao nível de preservação ecológica. Porém, o PAA atribui conceitos aos ambientes de acordo com suas pontuações, sendo:

- ✓ impactado = 0 a 40 pontos;
- ✓ alterado = 41 a 60 pontos;
- ✓ natural = 61 a 100 pontos.

Às avaliações de integridade ambiental devem ser adicionadas medidas de fatores abióticos, tomadas por medidores digitais de campo (sondas multiparâmetro, por exemplo), como temperatura (°C), pH, total de solutos dissolvidos (TDS), salinidade, condutividade e fluxo. Estas são medidas consideradas importantes para conhecimento e descrição do ambiente aquático e eventuais perturbações que afetam a biota, sejam elas naturais ou antrópicas (BUSS *et al.*, 2003).

4.8.4 Produtos

O Anexo 7 define a entrega dos seguintes produtos:

- Cronograma e planejamento logístico de execução dos estudos, que devem ser enviados ao ICMBio até 15 dias antes da primeira coleta;
- Relatórios semestrais descrevendo a metodologia empregada, resultados, discussões, análise integrada de todos os componentes monitorados, proposição de ações e medidas de recuperação, avaliação da necessidade de ajustes metodológicos e sugestões;
- Base de dados do monitoramento em planilhas eletrônicas, com os dados de campo e imagens em formato digital, a ser entregue semestralmente juntamente com os relatórios.

4.9 Anexo 8 - Monitoramento da sedimentação no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e regiões relacionadas

O Anexo 8 trata de um monitoramento oceânico para a região do Parque Nacional Marinho (PARNAM) dos Abrolhos em vista de sua importância ecológica e do risco potencial de os rejeitos provenientes do rompimento da Barragem de Fundão cheguem ao arquipélago

dos Abrolhos. Segundo o Anexo 8, os sobrevoos já realizados evidenciam o deslocamento da pluma de rejeitos para norte, próximo à linha de costa, entre a foz do rio Doce e o sul da Bahia.

Este monitoramento é proposto para acontecer em duas partes: (1) monitorar, em tempo real, a variação da turbidez da água do mar no arquipélago de Abrolhos para permitir comparações com imagens de satélite e tomadas de decisão de curto prazo; (2) monitorar, em caráter sazonal, o material particulado em suspensão no mar e a sedimentação na região, visando determinar a assinatura geoquímica do material aportado ou ressuspensionado. No que tange a esse material, o objetivo é determinar se os principais contribuintes do material sedimentar encontrado na região provêm da foz do rio Doce, do rejeito proveniente da barragem de Fundão e/ou do estuário de Caravelas (BA).

Para identificação das fontes geológicas/sedimentares que aportam no PARNAM é necessária comparação direta, em nível isotópico e multi-elementar, dos sedimentos amostrados na área recifal do Parque com os apontados pela literatura como potenciais termos-fonte.

O Anexo 8 menciona que o ICMBio mantém programa de monitoramento para avaliação da saúde dos recifes de coral em algumas Unidades de Conservação marinhas, incluindo o PARNAM dos Abrolhos, seguindo o protocolo *Reef Check*. Por isso, o Anexo define que este monitoramento deve ser executado nos mesmos pontos de amostragem já utilizados por aquele monitoramento para permitir a compatibilização de resultados e análises.

4.9.1 Área de Estudo

Conforme mencionado, os pontos de amostragem no PARNAM dos Abrolhos serão os mesmos já monitorados pelo Programa *Reef Check*, conduzido pelo ICMBio, no Arquipélago e Parcel dos Abrolhos. Como os sobrevoos evidenciaram o deslocamento da pluma ao norte, são adicionados dois pontos de amostragem no Parcel Coroa Vermelha, que recebe maior influência da área continental ao sul do estuário do Rio Caravelas.

O Anexo 8 define a utilização de um segundo conjunto com seis pontos de amostragem localizados no arco interno dos recifes de Abrolhos (Recifes de Viçosa e de Coroa Vermelha),

nos recifes ao sul do arquipélago (dois pontos) e em recifes-controle (Recifes de Fora e de Coroa Alta), estes localizados em Porto Seguro - BA (Quadro 14). No caso dos recifes de Viçosa e Coroa Vermelha, o Anexo menciona que já estão disponíveis dados pretéritos sobre a deposição de sedimentos e da comunidade recifal (CASTRO *et al.*, 2012).

Quadro 14 - Pontos de amostragem do Anexo 8 - TR4 para monitoramento da sedimentação no PARNAM de Abrolhos e região.

Pontos de Amostragem	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Arquipélago dos Abrolhos		
Portinho Sul	531801,78	8013808,42
Língua da Siriba II	530156,14	8013005,57
Parcel dos Abrolhos		
Chapeirão do Pierre	534920,20	8013852,91
Chapeirão da Berna	534785,02	8012257,76
Parcel Coroa Vermelha		
1 - Sul Coroa Vermelha	470464,90	8010444,49
2 - Norte Coroa Vermelha	484376,35	8019762,64
Sul do Arquipélago		
Abrolhos 1	532581,37	8009234,23
Abrolhos 2	533965,89	8010645,59
Arco Interno de Abrolhos		
Viçosa	472709,66	8010686,73
Coroa Vermelha	478706,48	8012876,15
Pontos-controle		
Recife de Fora	501511,00	8187064,06
Coroa Alta	508907,42	8211551,77

Fonte: Anexo 8, TR4.

4.9.2 Metodologias

- Acompanhamento em tempo real da turbidez na região do arquipélago dos Abrolhos (BA) e comparação com imagens de satélite

O Anexo 8 define como fundamental o monitoramento em tempo real das condições oceânicas para a tomada de decisões quanto à eventual ocorrência de traços da pluma de sedimentos na região dos Abrolhos. Por isso, propõe a implantação de um sistema formado por boia oceânica equipada com turbidímetro e transmissor para envio de dados via satélite, a ser instalado na face sul do Parcel dos Abrolhos por ser esta a face potencialmente impactada pela pluma. Os dados de turbidez devem ser enviados para laboratório apto para sua avaliação, sendo diariamente processado e comparado com imagens da região na banda do visível e com as condições dos campos de vento na base de tempo, ambas fornecidas pelo Earthview/NASA. A Figura 1 apresenta diagrama esquemático do sistema proposto e a Figura 2 descreve a boia oceânica.

Figura 1 - Diagrama esquemático do sistema proposto. Fonte: Anexo 8, TR4.

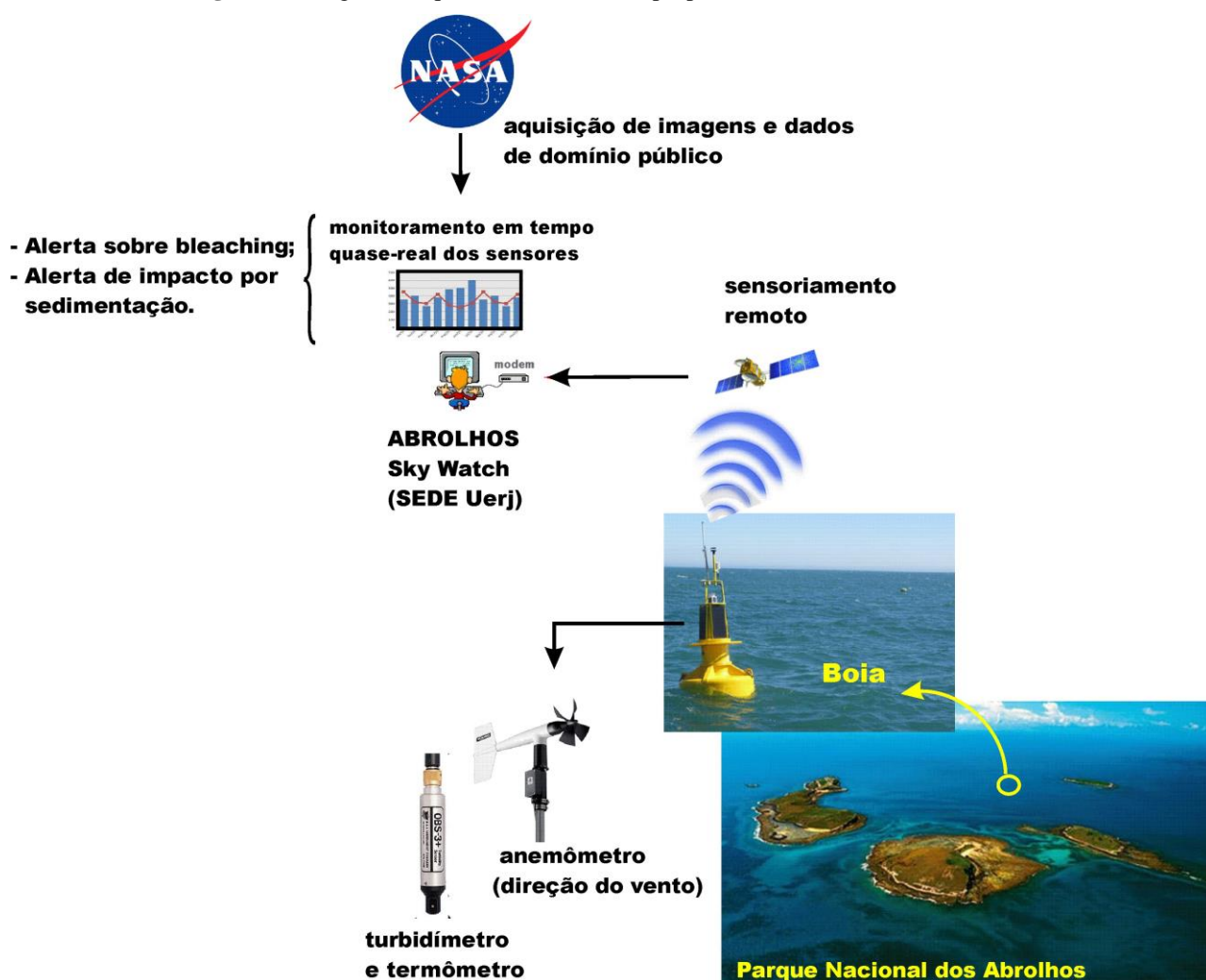


Figura 2 - Modelo de boia oceânica para monitoramento. Fonte: Anexo 8, TR4.



- Material particulado em suspensão na água do mar

O Anexo 8 informa que os estudos já conduzidos pelo ICMBio em parceria com a UERJ, FURG e Projeto Coral Vivo obtiveram diversas amostras do Arquipélago dos Abrolhos para as razões Fe:Mn na fração dissolvida da água do mar. Esta razão foi escolhida por se tratar dos elementos majoritários presentes na pluma de rejeitos (com exceção do Si) e por terem padrões de solubilidade diferenciados. Segundo o Anexo, estes dados permitem comparação com as medidas deste mesmo parâmetro realizadas pela CPRM no rio Doce antes e após o rompimento da barragem. Desta comparação resultou a evidência de que as razões Fe:Mn para o rejeito é significativamente menor (pico em torno de 0,5) que as razões dos sedimentos em Abrolhos (valores entre 50 e 100). Assim, o uso desta razão mostra-se potencialmente adequado para dar continuidade ao monitoramento em Abrolhos.

É proposto um volume de amostra de 20L de água do mar para assegurar a detectabilidade própria da técnica de composição elementar e dos isótopos radiogênicos (principalmente os isótopos de Nd). As amostras devem ser coletadas, tratadas e analisadas conforme descrito no Anexo 8 do TR4.

- Caracterização da Sedimentação em Abrolhos por Isótopos Radiogênicos

O Anexo 8 propõe a instalação de armadilhas de sedimento nos seis pontos do primeiro conjunto de amostragem do arquipélago dos Abrolhos (Quadro 14) para as análises de isótopos radiogênicos. As armadilhas serão trocadas a cada estação do ano e, adicionalmente, deve-se instalar uma roseta de garrafas de coleta para amostragem mensal, as quais deverão ser trocadas anualmente. Para a identificação da origem continental dos sedimentos, a combinação das assinaturas dos isótopos radiogênicos $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ é descrita pelo Anexo 8 como uma das mais qualificadas, devido, entre outros fatores, às suas razões típicas em determinados domínios geológicos (LEE *et al.*, 2010). Cita-se, ainda, que essas razões não estão sujeitas ao fracionamento isotópico resultante de intemperismo em estudos de curto prazo (GAIERO *et al.*, 2004).

Para a realização das análises isotópicas é necessário ter cuidados muito especiais nas diversas etapas do processo analítico. Por isso, as amostras devem ser coletadas, tratadas e analisadas conforme descrito no Anexo 8 do TR4.

- Caracterização da Sedimentação em Abrolhos por microanálise de MEV+EDS

O Anexo 8 menciona que, nos estudos anteriores desenvolvidos pelo ICMBio em parceria com a UERJ, as análises por MEV+EDS foram aplicadas à (1) fração fina dos sedimentos coletados na foz do rio Doce anteriores ao rompimento da barragem, (2) fração fina dos sedimentos da foz do rio Doce durante a presença da pluma de rejeitos e (3) sobre os filtros contendo material particulado das águas superficiais de Abrolhos. Nos estudos iniciais foram selecionadas 27 partículas e para cada uma foram determinadas as abundâncias relativas de C, O, Si, Al, Fe, Ti, Ca, Cl, Zn, Cu, K, Mg e Na. Os resultados possibilitaram a caracterização morfológica e as abundâncias relativas dos elementos sobre as micropartículas, ficando

evidente que as partículas de origem da lama de sedimentos apresentam abundância elevada de Fe, em níveis não encontrados tanto nos sedimentos de Abrolhos como na foz do rio Doce anterior ao rompimento. Dessa forma, o Anexo 8 sustenta que a análise de MEV+EDS deve ser realizada de forma contínua sobre o material particulado em suspensão na região de Abrolhos como forma de identificar e mensurar eventuais impactos da pluma de sedimentos naquele ambiente.

Dessa forma, o Anexo define a elaboração de um sistema de decisão sobre a ocorrência de traços do rejeito na região de Abrolhos, a ser estendido para outras áreas ao norte ou ao sul da foz do rio Doce. Todo o material coletado em cada uma das campanhas deverá ser confrontado com os dados de pré-existência, conforme os resultados já disponíveis.

- Monitoramento da saúde de corais de recifes próximos ao sul do Parque Nacional Marinheiros dos Abrolhos, além de recifes-controle fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos

O Anexo 8 sustenta que a identificação de eventuais alterações na estrutura das comunidades de recifes de corais em médio e longo prazo deve ser feita pela quantificação da cobertura coralínea e demais organismos associados. A metodologia seguirá Castro *et al.* (2012) com adaptações, utilizando-se alguns dos pontos de amostragem do estudo destes autores. Para verificar as razões de eventuais alterações na estrutura das comunidades, devem ser comparadas as amostragens sazonais (inverno e verão) da cobertura de organismos e estes dados associados à análise de dispersão dos sedimentos.

Para este monitoramento, quatro áreas com no mínimo 8m² em cada estação de amostragem (Quadro 14) devem ser delimitadas com pinos de aço inoxidável 316. O estado de saúde das colônias de corais e organismos bentônicos será monitorado dentro destes polígonos, devendo ser quantificada a densidade específica de colônias de corais e a densidade específica de colônias com indícios de deficiências na saúde, além da caracterização dos sintomas apresentados.

O Anexo 8 define que a caracterização dos sintomas específicos de branqueamento deve usar a técnica do *Coral Watch*, sendo também avaliada a integridade dos tecidos das colônias na área monitorada e verificados na literatura pertinente os sintomas de doenças já conhecidas e descritas para os corais recifais. Os dados obtidos serão tratados com estatística unifatorial e multifatorial, com a finalidade de detectar alterações significativas no estado de saúde das comunidades monitoradas.

Nos mesmos pontos deverá ser realizado o protocolo *Reef Check* (cujos detalhes de aplicação estão descritos em FERREIRA & MAIDA, 2006), utilizado pelo ICMBIO nas UCs marinhas federais. O protocolo deve ser aplicado em transectos colocados em quatro pontos distintos de cada localidade, acrescentando-se os recifes de Timbebas e pontos no Parcel das Paredes para comparação com os dados coletados no Arquipélago dos Abrolhos.

O Anexo determina que os dados coletados pelo protocolo *Reef Check* devem ser integrados ao monitoramento realizado pelo ICMBIO para avaliação de um conjunto de indicadores sobre a saúde recifal da região dos Abrolhos.

5. CRONOGRAMA

O cronograma é apresentado em arquivo à parte devido às suas dimensões. Optou-se por manter o cronograma com todas as ações em uma única planilha para entendimento das sequências de atividades e entregas de relatórios.

Observa-se que são mantidos de 30 a 60 dias para o processo de mobilização das equipes executoras antes do início dos estudos. A mobilização compreende:

- o desembolso da primeira parcela dos recursos previstos;
- o treinamento dos profissionais;
- a compra, pela contratada, dos insumos/equipamentos necessários à condução das atividades;
- reuniões técnicas e administrativas entre as equipes executoras e entre estas e a contratante, para alinhamento antes do início das atividades;
- verificação das licenças de coleta;
- outras ações pertinentes ao planejamento e preparação para a execução dos estudos.

Observa-se, ainda, que os prazos para início dos diversos estudos diferem. O prazo para início de cada estudo é previsto de acordo com os preparativos necessários e informações recolhidas junto aos especialistas nos temas.

Informa-se que as atividades de parte do Anexo 6, referente ao monitoramento da dinâmica reprodutiva de tartarugas marinhas, foi iniciado em setembro/2017 pela Fundação Pró-Tamar.

6. EQUIPE EXECUTORA

Quadro 15 – Equipe Executora Principal (Coordenadores Gerais e de Projetos)

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
1	Adalto Bianchini	Doutor II - Coordenador Geral	Ecotoxicologia e análises de contaminantes orgânicos e biomarcadores em amostras biológicas e metais em amostras ambientais (água, sedimento e biota)	FURG	1
2	Agnaldo Silva Martins	Doutor II - Coordenador de Projeto	Coordenador sub-proposta /relações com habitat com drones	UFES	6
3	Alessandra Delazari Barroso	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de fitoplâncton dulcícola	FAESA	3
4	Alex Cardoso Bastos	Doutor II – Coordenação Geral	Mapeamento de Habitats	UFES	3
5	Ana Cristina Teixeira Bonecker	Doutor II – Coordenador Projeto	Ictioplâncton	UFRJ	3
6	Ana Paula Cazerta Farro	Doutor II - Coordenador de Projeto	Realizar as análises laboratoriais de cetáceos; e subprojetos de Genética e Uso do habitat por ponto fixo e embarcado.	UFES	6
7	Anderson Geyson Alves de Araújo	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de macrófitas aquáticas	UFES	3
8	Anderson Geyson Alves de Araújo	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia demacrófitas aquáticas	UFES	3

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
9	Aureo Banhos	Doutor II - Coordenador de Projeto	Genética Populacional e Gestão de Dados	UFES	2
10	Björn Gucker	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ciclagem de matéria e fluxo de energia	UFSJ	3
11	Camilo Dias Junior	Doutor II - Coordenador Projeto	Fitoplankton	UFES	3
12	Diolina Moura Silva	Doutor II - Coordenador de Projeto	Responsável pela coordenação de monitoramento do restinga	UFES	5
13	Edmilson Costa Teixeira	Doutor II – Coordenação Geral	Integração e Atuação em Rede	UFES	Todos
14	Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de zooplâncton dulcícola	UFOP	3
15	Eustáquio Vinícios Ribeiro de Castro	Doutor II – Coordenação Geral	Gestão de Projetos	UFES	Todos
16	Gilberto Barroso	Doutor II – Coordenação Geral Anexo	Análise de aporte de nutrientes e poluentes	UFES	3
17	Gilberto Menezes Amado Filho	Doutor II – Coordenador Projeto	Fundos Recifais – Responsável pelo componente algas/rodolitos/CAUs	JBRJ	3
18	Heitor Evangelista	Doutor II - Coordenador de Projeto	Sedimentologia Marinha	UERJ	8

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
19	Iola Gonçalves Boechat	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Mixotrofia e ecofisiologia de organismos	UFSJ	3
20	Jacqueline Albino	Doutor II - Coordenador de Anexo	Responsável pelo componentes plancton, água e zooxantelas	UFES	4
21	Jean-Christophe Joyeux	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Coordenador de Sub-projeto - rede trófica	UFES	7
22	Jorge Dergam	Doutor II - Coordenador	Projeto Genética de Peixes	UFV	2 e 7
23	Karla Gonçalves da Costa	Doutor II – Coordenador Projeto	Coordenadora Análises da Fauna Bentônica	UFES	4
24	Leandro Bugoni	Doutor II - Coordenador de Projeto	Coordenador do sub-projeto de estudo do impacto sobre as aves marinhas.	FURG	6
25	Leila Longo	Doutor II – Coordenador Temático Bentos	Bentos	UFRB	3
26	Luiz Fernando Loureiro Fernandes	Doutor II – Coordenador	Projeto Zooplâncton	UFES	3
27	Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima	Doutor II – Coordenador Projeto	Coordenar as atividades relativas as análises geoquímicas dos sedimentos	UFES	4

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
28	Maurício Hostim-Silva	Doutor II - Coordenador de Projeto	coordenar o projeto de ictiofauna estuarina/marinha	UFES	7
29	Mônica Maria Pereira Tognella	Doutor II - Coordenador de Projeto	Responsável pela coordenação de monitoramento do manguezal	UFES	5
30	Renato Ghisolfi	Doutor II – Coordenador Projeto	Modelagem	UFES	3
31	Renato Rodrigues Neto	Doutor II – Coordenador Projeto	Análises Hidrogeoquímica	UFES	3
32	Rodrigo Leão de Moura	Doutor II – Coordenador Projeto	Responsável pelos componentes recifes, sedimento e SIG	UFRJ	3
33	Sarah Maria Vargas	Doutor II - Coordenador de Projeto	Tartarugas Marinhas	UFES	6
34	Valéria da Silva Quaresma	Doutor II – Coordenador Projeto	Sedimentologia	UFES	3
35	Valéria de Oliveira Fernandes	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia do perifíton	UFES	3

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDAD, J.E. 2001. **Minerais Pesados**: uma ferramenta para prospecção, proveniência, paleogeografia e análise ambiental. São Paulo: Imprensa Universitária, Centro Gráfico da UFMG, 80 p.

ALTMANN, J. 1974. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, 49: 227-267.

ANDERSON, M.J.; GORLEY, R.N.; CLARKE, K.R. 2008. **PERMANOVA for PRIMER**: guide to software and statistical methods. Plymouth: PRIMER-E.

ANSCHUTZ, P.; DEBORDE, J. Spectrophotometric determination of Phosphate in Matrices from Sequential Leaching of Sediments. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 14, p. 245-256, 2016.

APHA. 1989. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington: American Public Health Association.

ARGOS. 1996. User's manual. CLS/Service Argos, Toulouse.

ARMSTRONG, F. A. J.; STEARNS, C. A.; STRICKLAND, J. D. H. The Measurement of Upwelling And Subsequent Biological Processes by Means of the Technicon Autoanalyzer and Associated Equipment. **Deep-Sea Research**, v. 14, p. 381-389, 1967.

BECAK, W. & PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Nobel, 1976.

BEVAN, E.; WIBBELS, T.; NAVARRO, E.; ROSAS, M.; NAJERA, B.M.Z.; SARTI, L.; ILLESCAS, F.; MONTANO, J.; PEÑA, L.J.; BURCHFIELD, P. 2016. Using unmanned aerial vehicle (UAV) technology for locating, identifying, and monitoring courtship and mating behavior in the Green Turtle (*Chelonia mydas*). **Herpetological Review**, 47 (1): 27-32.

BLOTT, S. & PYE, K. 2001. Gradistat: A grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. **Earth Surface Processes and Landforms**, 26: 1237-1248.

BRANCO, J.O. 1993. Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 36(1): 133-148.

BRANCO, J.O.; BARBIERI, E.; FRACASSO, H.A.A. 2010. Técnicas de pesquisa em aves marinhas. In: Von Matter, S.; Straube, F.; Accordi, I.; Piacentini, V.; Cândido-Jr., J.F. (Orgs). **Ornitologia e Conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, p. 219-235.

BRITO, M.F.G. & BAZZOLI, N. 2003. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 55(5): 624-633.

BUFFLAP, S. E. & ALLEN, H. E. (1995). Sediment pore water collection methods for trace metal analysis: a review. **Water Research**, 29, 165-177.

BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, 19(2): 465-473.

CALLISTO, M.; FERREIRA, W.R.; MORENO, P.; GOURLART, M.; PETRUCIO, M. 2002. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, 14(1): 91-98.

CANDIA-GALLARDO C., AWADE M., BOSCOLO D., BUGONI L. 2010. Rastreamento de aves através de telemetria por rádio e satélite. Pp. 255-280, In: Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento. VON MATTER S, STRAUBE FC, CÂNDIDO JR JF, PIACENTINI V, ACCORDI I (eds.). **Technical Books** Editora, Rio de Janeiro.

CASTRO, C.B.; SEGAL, B.; NEGRÃO, F.; CALDERON, E.N. 2012. Four-year monthly sediment deposition on turbid southwestern Atlantic coral reefs, with a comparison of benthic assemblages. **Brazilian Journal of Oceanography**, 60: 49-63.

CHILDRESS, J.J. & SOMERO, G.N. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, 52: 273-283.

CLARKE, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, 18: 117-143.

COLWELL, R.K. & CODDINGTON, J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 345(1311): 101-118.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. 2005. **Resolução N° 357, de 17 de março de 2005.**

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, 144: 2001-2014.

CUNHA, A.M.; CUNHA, G. M.; SARMENTO, R.A.; CUNHA, G. M. & AMARAL, J. F. T. 2006. Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de *Acacia* sp. **Revista Árvore**, 30(2): 207-214.

DANILEWICZ, D.; MORENO, I.B.; OTT, P.H.; TAVARES, M.; AZEVEDO, A.F.; SECCHI, E.R.; ANDRIOLO, A. Abundance estimate for a threatened population of franciscana dolphins in southern coastal Brazil: uncertainties and management implications. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 90, p. 1659-1666, 2010.

DANILEWICZ, D.; ZERBINI, A.N.; ANDRIOLO, A.; SECCHI, E.R.; SUCUNZA, F.; FERREIRA, E.; DENUNCIO, P.; FLORES, P.A.C. Abundance and distribution of an isolated population of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in southeastern Brazil: red alert for FMA I? Paper SC/64/SM17 presented to the IWC Scientific Committee. Panama 2012.

DIAS, J.A. 2004. **A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos (Uma Introdução à Oceanografia Geológica).** Disponível em: <http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/eb_Sediment.html>.

DUBEY, J. P. & DESMONTS, G. 1987. Serologic responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, 1(4): 337-339.

DUBEY, J. 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, 116: 275–296.

DUDZINSKI, K.M.; CLARK, C.W.; WÜRSIG, B. 1995. A mobile video/acoustic system for simultaneous underwater recording of dolphin interactions. **Aquatic Mammals**, 21: 187-194.

DUNBAR, S.G., ITO, H.E., BAHJRI, K., DEHOM, S., SALINAS, L. 2014. Recognition of juvenile hawksbills *Eretmochelys imbricata* through face scale digitization and automated searching. **Endangered Species Research**. 26: 137 – 146.

ELLISON, A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. **Ecology Letters** 7:509–520.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JR., V.; FEATHER-STONE, R.M.A. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7(2):88-95.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1996. **Method 3050B**. Acid digestion of sediments, sludges, and soils. CD Rom, 3050B-2, Revision 2 - December 1996.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2014. **Method 8270D**. Semivolatile Organic Compounds By Gas Chromatography/Mass Spectrometry. SW-846 Update V, 8270D-71, Revision 5 July 2014.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10: 564-567.

FARIA, F.A.; SILVA-COSTA, A.; GIANUCA, D.M.; BUGONI, L. 2016. Cooi heron (*Ardea cocoi*) connects estuarine, coastal, limnetic and terrestrial environments: an assessment based on conventional dietary and stable isotope analysis. **Estuaries and Coasts**, 39: 1271-1281.

FÉLIX, G.B.V. 2011. **Ocorrência e captura accidental de golfinhos no extremo norte do litoral do Espírito Santo**. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo - CEUNES, 54 p.

FERREIRA, B. P. e MAIDA, M. 2006. Monitoramento dos recifes de coral do Brasil. Brasília: MMA, 2006. **Série Biodiversidade**, 18.

FOLK, R. & WARD, W. 1957. Brazos river bar: A study in the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Research**, 27(1): 3-26.

FRANCINI-FILHO, R.B.; MOURA, R.L.; THOMPSON, F.L.; REIS, R.M.; KAUFMAN, L.; KIKUCHI, R.K.P.; LEÃO, L.M.A.N. 2008. Disease leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, 56: 1008-1014.

FRIDOLFSSON, A.K & ELLEGREN H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology**, 30: 116–121.

GAUCH JR., H.G. 1982. **Multivariate Analysis in Community Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 298 p.

GERACI, J.R.; LOUNSBURY, V.L. 2005. **Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings**. 2ed. Baltimore: National Aquarium.

GOUDET, J. 2001. **FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>.

GOULD, P.J. & FORSELL, D.J. 1989. Techniques for shipboard surveys of marine birds. **Fish and Wildlife Technical Report**, 25: 1-24.

HEINEMANN, D. 1981. A range finder for pelagic bird censusing. **Journal of Wildlife Management**, 45 :489-493.

HENRY, R.P. 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G.; Carters, N.D. (Eds.) **The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics**. New York: Plenum, p. 119-125.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silverstained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, 16: 473-477.

HOHN, A.A.; CHIVERS, S.J.; BARLOW, J. 1985. Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins *Stenella attenuata*, in the eastern tropical pacific. **Marine Mammals Science**, 1(4): 273-293.

HYNES, H.B.N. 1950. The food of freshwater sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*) with a review of methods used in studies of the food of fishes. **Journal of Animal Ecology**, 19: 36-58.

HYSLOP, E. J. 1980. Stomach content analysis: a review of methods and their applications. **Journal of Fish Biology**, 17(4): 411-429.

JURADO, J.M.; ALCAZAR, A.; PABLOS, F.; MARTÍN, M.J.; GONZÁLES, A.G. 2005. Classification of aniseed drinks by means of cluster, linear discriminant analysis and soft independent modelling of class analogy based on their Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na and Si content. **Talanta**, 66: 1350-1354.

KALINOWSKI, S.; TAPER, M.; MARSHALL, T. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**. 16: 1099–1006.

KAWAKAMI, E. & VAZZOLER, G. 1980. Método gráfico e estimativa de índice alimentar aplicado ao estudo de alimentação de peixes. **Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo**, 2(29): 205-207.

KOLENISKOVAS, C.A.M.; NIEMEYER, C.; TEIXEIRA, R.H.F., NUNES, A.L.V.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L.C.; SANT'ANNA, S.S.; CATÃO-DIAS, J.L. 2012.

Hematologic and plasma biochemical values of Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 26(3): 125-129.

KOROLEFF, F. Direct determination of ammonia in natural waters as Indophenol Blue. **International Conference of the Exploration of the Sea**, n.9, 1969.

LEHNER, P.N. 1997. **Handbook of ethological methods**. London: Garland STPM Press.

MAGURRAN, A.E. 1988. **Ecological diversity and its measurement**. London: Croom HEBN, 179 p.

MANLY, B.F.J. 1997. **Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology**. 2ed. London: Chapman & Hall.

MARQUES, F.F.C.; BUCKLAND, S.T. 2003. Incorporating covariates into standard line transect analyses. **Biometrics**, v. 59, p. 924-935.

McCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, 244: 6049-6055.

McNAUGHTON, S.J. 1968. Structure and Function in California Grasslands. **Ecology**, 49: 962-972.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2014. Portaria Nº 444, de 17 de Dezembro de 2014: Reconhece como espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção” - Lista, conforme Anexo I da presente Portaria, em observância aos arts. 6º e 7º, da Portaria nº 43, de 31 de janeiro de 2014. **Diário Oficial da União**, 245: 121-144.

MUEHE, D. 1998. Estado Morfodinâmico Praial no Instante da Observação: uma alternativa de identificação. **Revista Brasileira de Oceanografia**, 46(2): 157-169.

MUEHE, D. 2004. Método de levantamento topo-batimétrico do sistema praia-antepraia. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, 5(1): 95-100.

MUEHE, D.; ROSO, R.; SAVI, D.C. 2003. Avaliação de método expedito de determinação do nível do mar como *datum* vertical para amarração de perfis de praia. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, 4(1): 53-57.

MÜLLER, G. (1969). Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. **Geological Journal**, 2, 109-118.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NADELLA, S.R.; FITZPATRICK, J.L.; FRANKLIN, N.; BUCKING, C.; SMITH, S.; WOOD, C.M. 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, 149: 340-348.

NESSIMIAN, J.L.; VENTICINQUE, E.M.; ZUANON, J.; DE MARCO JR., P.; GORDO, M.; FIDELIS, L.; BATISTA, J.D.; JUEN, L. 2008. Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. **Hydrobiologia**, 614: 117-131.

OAKES, K.D. & VAN DER KRAAK, G.J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, 63: 447-463.

PAIVA, J. B.; STERZO, E. V.; RIBEIRO, S. A.; PEREIRA, E. A.; BERCHIERIJÚNIOR, A. 2006. Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto por amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. **Arquivos do Instituto Biológico**. 73(3): 236-269.

PARK, S.D.E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Tese (Pós-Doutorado), Universidade de Dublin.

PARNELL, A.C.; INGER, R.; BEARHOP, S.; JACKSON, A.L. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. **PLoS ONE**, 5(3): e9672.

PASCOALINI, S. S. 2014. **Eficiência Fotossintética de Manguezais na Baía de Vitória, ES.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Ambiental, 61 p.

PÉQUEUX, A. & CHAPELLE, S. 1982. Na⁺-K⁺-ATPase activity and phospholipids in two euryhaline crabs related to changes in the environmental salinity. **Marine Biology Letters**, 3: 43-52.

PINEDO, M.C. & HOHN, A.A. 2000. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for a precision in the age estimation. **Marine Mammal Science**, 16(1): 1-27.

POST, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. **Ecology**, 83: 703-718.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945-959.

REIS, E.C.; SOARES, L.S.; VARGAS, S.M.; SANTOS, F.R.; YOUNG, R.J.; BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; LÔBO-HAJDU, G. 2010. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. **Conservation Genetics**, 11: 1467-1477.

REMANE - REDE DE ENCALHE DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS NO NORDESTE. 2005. **Protocolo de Conduta para Encalhes de Mamíferos Aquáticos da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste.**, Recife: REMANE, IBAMA, 298 p.

RIBEIRO, A.C.; BATISTA, M.T.O.; RODRIGUES JR., E.; OLIVEIRA, M.F.; VANI, G.S.; RODRIGUES, E.; SUDA, C.N.K. 2015. Atividades de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadoras de impacto ambiental. **Revista Ambiente & Água**, 10: 793-803.

RICHARD, K.R.; MCCARREY, S.W.; WRIGHT, J.M. 1994. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. **Canadian Journal of Zoology**, 72: 873-877.

ROSEL, P.E. 2003. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. **Conservation Genetics**, 4: 647-649.

SALLENGER, A.H.; KRABILL, W.; BROCK, J.; SWIFT, R.; MANIZADE, S.; STOCKDON, H. 2002. Sea-cliff erosion as a function of beach changes and extreme wave runup during the 1997-1998 El Niño. **Marine Geology**, 187(3-4): 279-297.

SANTOS-NETO, E.B.; AZEVEDO-SILVA, C.E.; BISI, T.L.; SANTOS, J.; MEIRELLES, A.C.; CARVALHO, V.L.; AZEVEDO, A.F.; GUIMARÃES, J.E.; LAILSON-BRITO, J. 2014. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the Northeastern Brazil. **Science of the Total Environment**, 472: 194-203.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. & CINTRON, G. 1986. **Guia para estudo de áreas de manguezal: estrutura, função e flora**. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 186 p.

SHAMBLIN, B.M.; BOLTEN, A.B.; ABREU-GROBOIS, F.A.; BJORNDAL, K.A.; CARDONA, L.; CARRERAS, C.; CLUSA, M.; MONZÓN-ARGÜELLO, C.; NAIRN, C.J.; NIELSEN, J.T.; NEL, R.; SOARES, L.S.; STEWART, K.R.; VILAÇA, S.T.; TÜRKÖZAN, O.; YILMAZ, C.; DUTTON, P.H. 2014. Geographic patterns of genetic variation in a broadly distributed marine vertebrate: new insights into loggerhead turtle stock structure from expanded mitochondrial DNA sequences. **PLoS ONE**, 9: e85956.

SHORT, A.D. 1979. Three dimensional beach-stage model. **Journal of Geology**, 87(5): 553-571.

SMITH, B. & WILSON, J. A 1996. Consumers' Guide to Evenness Indices. **Oikos**, 76(1): 70-82.

SMOLOWITZ RJ, PATEL SH, HAAS HL, MILLER SA. 2015 Using a remotely operated vehicle (ROV) to observe loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) behavior on foraging grounds off the mid-Atlantic United States. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 471: 84-91.

SOUSA, R.M. 2015. Avaliação da Contaminação das Areias de Praia do Litoral do Espírito Santo por Elementos-traço. Dissertação de Mestrado - PPGQUI/CCE/UFES, Vitória, 120p.

SPEAR, L.B.; AINLEY, D.G.; HARDESTY, B.D.; HOWELL, S.N.G.; WEBB, S.W. 2004. Reducing biases affecting at-sea surveys of seabirds: use of multiple observer teams. **Marine Ornithology**, 32: 147-157.

STOCKDON, H.F.; HOMAN, R.A.; HOWD, P.A.; SALLENGER, A.H. 2006. Empirical parameterization of setup, swash and runup. **Coastal Engineering**, 53(7): 573-588.

TABATABAI, M.A. 1974. A rapid method for determination of sulfate in water samples. **Environmental Letters**, 7: 237-243.

TASKER, M.L.; JONES, P.H.; DIXON, T.; BLAKE, B.F. 1984. Counting seabirds at sea from ships: a review of methods employed and a suggestion for a standardized approach. **Auk**, 101: 567-577.

TER BRAAK, C.J.F. & SMILAUER, P. 2002. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide**: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca: Microcomputer Power, 500 p.

TOGNELLA-DE-ROSA, M.M.P. 2000. **Manguezais Catarinenses, Baía da Babitonga e Rio Tavares: uma abordagem ecológica e econômica**. Tese de Doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 216 p.

VAJRESWARI, A.; SRINIVASA RAO, P. KAPLAY, S.S.; TULPUL, P.G. 1983. Erythrocyte membrane in rats fed high eurycic acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, and (Na⁺,K⁺)- and (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPases. **Biochemica Medica**, 29: 74-84.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4: 535-538.

VALDERRAMA, J. C. The Simultaneous Analysis of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Natural Waters. **Marine Chemistry**, v. 10, p. 109-122, 1981.

VARGAS, S.M.; ARAUJO, F.C.F.; MONTEIRO, D.S.; ESTIMA, C.E.; ALMEIDA, A.P.; SOARES, L.S.; SANTOS F. 2008. Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. **Journal of Heredity**, 99(2): 215-220.

VARGAS, S.M.; MOLFETTI, E.; VILAÇA, S.T.; MONTEIRO, D.; ESTIMA, S.C.; SOARES, L.S.; ALMEIDA, A.P.; THIOSY, B; NARO-MACIEL, E.; SANTOS, F.R. 2013. Mixed stock analysis of leatherback turtles feeding in Brazil: records over four years. Baltimore: **Proceeding of the 33rd Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation**.

VAZZOLER, A.E.A. 1996. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 169 p.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Metiterranean and Antartic molluscs. **Marine Environmental Research**, 44: 69-84.

VOORSPOELS, S.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. 2003. Polybrominated Diphenyl Ethers in marine species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: levels, profiles, and distribution. **Environmental Science & Technology**, 37: 4348-4357.

WOLD, S.; 1987 Principal Componente Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 2:37–52.

WILSON, B.W. & HENDERSON, J.D. 2007. Determination of Cholinesterase in Blood and Tissue. **Current Protocols in Toxicology**, 12: 12-13.

WRIGHT, LD, SHORT, AD 1984 Morphodynamic variability of surf zones and beaches: A synthesis. **Marine Geology**, 56:93-118.

ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 930 p.

ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; DANILEWICZ, D.; ANDRIOLO, A.; LAAKE, J.L.;AZEVEDO, A.F. 2010. Abundance and distribution of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the Franciscana Management Area II (southeastern and southern Brazil). Paper SC/62/SM7 presented to the IWC Scientific Committee. Agadir, Morocco: 14p.