

Código:		PLANO DE TRABALHO	 FUNDAÇÃO renova
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

Plano de Trabalho - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente.

FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE PLANO DE TRABALHO

Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática – PMBA

Vitória, 31 de agosto de 2022

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

1. Identificação

1.1 Dados do Proponente:

Instituição:	Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Nome do Coordenador do Projeto:	Eustáquio Vinícius Ribeiro De Castro
Telefone:	(27) 98819-2070
E-mail:	eustaquiovinicius@uol.com.br
Endereço:	Av. Fernando Ferrari, 845, Campus Universitário, Bairro Goiabeiras
Cidade:	Vitória
Estado:	Espírito Santo
CEP:	29.075-910

1.2 Proponente Interveniente: (quando aplicável)

Nome do Interveniente:	Fundação Espírito-Santense de Tecnologia - FEST
Nome do Responsável:	Armando Biondo Filho
Cargo:	Superintendente
Endereço:	Av. Fernando Ferrari, 845, Campus Universitário, Bairro Goiabeiras, Vitória - ES
Telefone:	(27) 99975-4214 / 3345-7555
E-mail:	armando.biondo@fest.org.br

1.3 Área da Fundação Renova

Requisitante Fundação:	Laila Carina Campos Medeiros
Cargo:	Especialista da Biodiversidade
Telefone:	(31) 98413-7744
E-mail:	laila.medeiros@fundacaorenova.org

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

2. Dados do Projeto

Título do Projeto:	Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente.
Duração (em meses):	23
Projeto em Rede:	(☒) Sim (☐) Não
Tipo de Pesquisa (quando aplicável):	☐ Pesquisa Básica ☒ Pesquisa Aplicada ☐ Desenvolvimento ☐ Transferência de Tecnologia ☐ Outros: Especificar _____
Valor Total (R\$):	R\$ 199.823.973,06
Orçamento Aprovado?	(☐) Sim (☐) Não

3. Resumo do Projeto

Trata-se do plano de trabalho elaborado para continuidade do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – porção capixaba do rio Doce e região marinha e costeira adjacente, considerando, como base, o escopo proveniente da revisão do Termo de Referência 4, realizada em 2021, visando dar continuidade à avaliação evolutiva das consequências do aporte de rejeito de mineração, oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG) nos ecossistemas aquáticos e na biodiversidade associada. O PMBA será desenvolvido com monitoramento durante 23 meses na malha amostral e parâmetros ambientais indicados no anexo 1, buscando identificar e evidenciar os impactos decorrentes do aporte de rejeito de mineração sobre a biota aquática e seus habitats e monitorá-los. O presente Plano de Trabalho não contempla o monitoramento Ecotoxicológico.

4. Justificativa do Projeto

O presente Plano de Trabalho foi elaborado a pedido da Fundação Renova, considerando, como base, o escopo do Termo de Referência 4 - Revisado em 2021, referente à Cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta (TTAC) entre União, Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, autarquias federais e estaduais com a SAMARCO Mineração S.A., VALE S.A. e BHP BILLITON BRASIL LTDA.

O projeto insere-se no contexto da continuidade dos monitoramentos do PMBA, realizados a partir de 2018, bem como dos demais estudos ambientais que os antecederam, sejam pretéritos ou não ao rompimento da barragem de rejeitos. O Termo de Referência 4 – Primeira Revisão, apresenta uma série de direcionamentos, os quais são considerados, em sua maioria, neste projeto, tendo como foco principal a efetiva integração dos resultados dos monitoramentos, a ser realizada nos ambientes dulcícola, costeiro e marinho, porém com possibilidade de novas inserções de temas.

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

Com duração de monitoramento prevista de 23 meses, pretende-se ao longo dos anos modelar a dinâmica ecossistêmica, gerando subsídios para a implementação de estratégias de planejamento e conservação da biodiversidade, através de cenários de intervenções, projeções e estratégias de manejo.

Resultados, indicadores de qualidade ambiental, avaliação de impactos e suas representações, já elaboradas ao longo do PMBA e mantidas no presente projeto, serão utilizadas e aperfeiçoadas, caso necessário, assim como a indicação de medidas reparatórias e mitigadoras.

Desta forma, o projeto possui memória e se moldará conforme medidas que visem reparar ou mitigar impactos ambientais sejam implementadas; ou seja, poderá ser necessário ao longo do tempo reavaliar a estratégia de abordagem do problema ambiental analisado.

Esta abordagem qualifica a proposta e direciona o projeto para uma fase do PMBA onde o monitoramento de complexas interações ecológicas torna-se uma eficiente estratégia na compreensão de padrões e processos ecossistêmicos a longo prazo.

O Brasil ainda não possui, a rigor, outro conjunto de estudos de pesquisas técnico-científicas que promovam um conhecimento tão abrangente sobre os impactos ambientais provocados pelo desastre ambiental devido ao rompimento da barragem de rejeitos de minério de Fundão, como o PMBA atualmente em execução. Os dados obtidos no PMBA têm fornecido estimativas de como a resiliência do ambiente foi atingida com o evento. Entretanto, a indisponibilidade de informações pretéritas suficientes sobre a estrutura dos ecossistemas que caracterizam o capital natural do baixo Rio Doce dificulta em algum grau a conexão causal direta, sobretudo considerando-se os múltiplos impactos de fundo existentes na Bacia.

Neste contexto, a hipótese central a ser testada no projeto é a de que o ecossistema fluvio-marinho do Baixo Rio Doce já se encontrava impactado por ações antrópicas históricas e contemporâneas e que a intrusão da onda de rejeitos do rompimento da barragem de Fundão representou um impacto agudo ao ecossistema, alterando drasticamente os processos ecológicos estruturais e a biodiversidade, com reflexos sobre a oferta de bens e serviços ecossistêmicos. A estrutura atual da biocenose e os processos funcionais do ecossistema são derivados de um processo de sucessão ecológica, ainda sob influência de eventos crônicos da presença do rejeito, cuja dinâmica e padrões só poderão ser detectados em associação com uma consistente base temporal de observações e ferramentas integrativas de modelamento ecológico.

5. Justificativa da instituição e do Interesse convergente

A Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, fundada em 1954, atua em praticamente todas as áreas do conhecimento, tanto no nível de graduação como da pós graduação. A Ufes funciona em quatro Campi Universitários: Goiabeiras e Maruípe, em Vitória; Alegre e São Mateus, no interior do estado, bem como polos de ensino em mais de 70% do estado. Especificamente nas áreas do escopo do projeto em tela, a Ufes executa vários trabalhos e projetos alinhados com seu Plano de Desenvolvimento Institucional (PDI), necessários no cumprimento das formalidades legais.

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

A implementação do projeto em epígrafe é de interesse institucional, sendo bastante relevante para a UFES e de grande interesse público pelos seguintes motivos, dentre outros:

1. Corresponde a um projeto de pesquisa de interesse regional e nacional;
2. Viabiliza a participação de docentes, técnicos e alunos da instituição;
3. Proporciona melhorias na infraestrutura acadêmica da instituição;
4. Permitirá que parte de conhecimentos de ciência, tecnologia e inovação acumulados e gerados na instituição possam ser mais bem aplicados visando o desenvolvimento sustentável da nossa região e do país;
5. Agrega valor à instituição, seja intelectual, acadêmica, estrutural ou social, demonstrando ainda a importância e relevância do projeto pretendido no meio acadêmico;
6. Colabora com a sociedade e também com os ecossistemas atingidos.

Vale destacar que a Ufes participa atualmente, como anuente e gestora, da equipe multidisciplinar em diversas áreas desta universidade, relacionada à implementação do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I, porção capixaba do rio Doce e região marinha e costeira adjacente – PMBA.

6. Objetivos

6.1 Geral

Executar o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente (PMBA), para os Ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho, considerando como base o escopo proveniente da revisão do Termo de Referência 4, realizada em 2021, visando dar continuidade à avaliação evolutiva das consequências do aporte de rejeito de mineração, oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG) nos ecossistemas aquáticos e na biodiversidade associada. O PMBA será desenvolvido na malha amostral e parâmetros ambientais indicados no presente Plano de Trabalho (anexo 1), buscando identificar e evidenciar os impactos decorrentes do aporte de rejeito de mineração sobre a biota aquática e seus habitat e monitorá-los. Isso será alcançado através dos seguintes objetivos específicos.

6.2 Específicos

1. Avaliar a dinâmica espacial e temporal da biodiversidade aquática e os processos responsáveis por essa dinâmica, constantes no anexo 1, considerando a malha e periodicidades indicadas.
2. Analisar de forma integrada as tendências espaço-temporais do ecossistema, com identificação da sincronia entre comunidades biológicas, resiliência e estabilidade de comunidades biológicas, e interações entre componentes abióticos e bióticos.

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

3. Analisar o comportamento do ecossistema frente a diferentes cenários através de modelagem dinâmica, identificando as características críticas para o funcionamento dos sistemas.
4. Integrar o fluxo hidrológico e a dispersão da pluma, bem como sua qualidade, possibilitando a identificação de alterações nos padrões observados, influência na biodiversidade aquática e eficácia de medidas de recuperação.
5. Definir locais que podem ser fonte de espécies para o *pool* regional de espécies da Bacia Hidrográfica do rio Doce e região costeira adjacente.
6. Subsidiar as ações de conservação, reparação, restauração e manejo da biodiversidade aquática, no âmbito da região monitorada, através da integração de dados e modelagem ecossistêmica.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

7. Marco Lógico

Objetivo Geral	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Executar o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente (PMBA), para os ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho, buscando identificar e evidenciar os impactos decorrentes do aporte de rejeito de mineração sobre a biota aquática e seus habitats e monitorá-los, conforme o presente Plano de Trabalho.	Hidrodinâmica fluvio-marinha; Material particulado em suspensão dulcícola e marinho; Qualidade da água e sedimento nos ambientes dulcícola, costeiro e marinho; Índice mineralógico (IMS) no ambiente marinho; Mobilidade sedimentar no ambiente marinho; Mapeamento de habitats no ambiente marinho; Inventário das comunidades aquáticas dulcícolas, costeiras e marinhas; Inventário da flora costeira (vegetação de restinga e manguezal) Fenologia, fitossociologia e contaminação da flora costeira Índices bióticos Ecologia trófica e biologia reprodutiva das comunidades aquáticas dulcícolas e marinhas (ictiofauna e megafauna) Avaliação genética da fauna dulcícola, costeira e marinha	Relatórios técnico-científicos; Workshops técnico-científicos; Relatórios gerenciais; Banco de dados brutos.	• Relatório de Acompanhamento Físico mensal e prestação de contas mensal • Relatório Gerencial Trimestral: meses 4, 6, 10, 15, 19 e 21 • Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22 • Dados brutos atualizados mensais	Condições meteorológicas, hidrológicas e oceanográficas desfavoráveis que possam inviabilizar a realização de campanhas de campo; Fatores exógenos que impossibilitem o acesso a estações amostrais; Fatores exógenos que comprometam a interpretação e integração de indicadores; Fatores exógenos que comprometam a determinação das comunidades aquáticas referente aos temas desta proposta; Prejuízos/perdas de equipamentos causados por terceiros que possam ocasionar perda de dados; Condições sanitárias derivadas da pandemia COVID-19 que podem comprometer as coletas e análises em laboratório Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Objetivo Específico 1	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Avaliar a dinâmica espacial e temporal da biodiversidade aquática e os processos responsáveis por essa dinâmica, constantes no presente Plano de Trabalho, considerando a malha, parâmetros analisados e periodicidades indicadas.	Consolidação dos dados sedimentológicos, geoquímicos, oceanográficos e limnológicos dos habitats-alvo do monitoramento. Identificação/apresentação da composição, riqueza, diversidade e processos fisiológicos/oxidativos das comunidades biológicas. Identificação da distribuição espacial da diversidade alfa e suas relações com <i>turnover</i> de espécies. Análises integrativas da dinâmica de contaminantes e seus efeitos sobre os indicadores biológicos	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.
Metas	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Monitoramento e avaliação dulcícola: fitoplâncton, zooplâncton, perifíton, macrófitas, ictiofauna, macroinvertebrados limnologia, qualidade de água e sedimentos, vazões e fluxo de sedimentos, modelagem hidrológica, modelagem de sedimentos, ações na bacia do Rio Doce. Monitoramento e avaliação marinha: oceanografia física, sedimentologia, fontes de materiais sedimentares, mapeamento de habitat, hidrogeoquímica, plâncton (fito, zoo e ictio), bentos fundo inconsolidado, fundos recifais, rodólitos e macroalgas, megafauna, ictiofauna e carcinofauna estuarina e marinha Monitoramento e avaliação da flora e fauna costeira.	Caracterização dos dados sedimentológicos, hidrogeoquímicos, mete oceanográficos e limnológicos dos habitats-alvo do monitoramento. Listagem e descrição da composição, riqueza, diversidade biológica/genética, uso do habitat e processos comportamentais, fisiológicos/oxidativos das comunidades biológicas.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Objetivo Específico 2	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Analisar de forma integrada as tendências espaço-temporais do ecossistema, com identificação da sincronia entre comunidades biológicas, resiliência e estabilidade de comunidades biológicas, e interações entre componentes abióticos e bióticos.	Padrões e tendências da biodiversidade Padrões e tendências da qualidade da água e sedimentos Riqueza funcional; Abundância, riqueza de espécies (alfa, beta e gama), diversidade biológica/genética e trófica, esclerocronologia; Integração dos resultados com o bando de dados do PMQQS; Matrizes correlacionais de dados abióticos e bióticos; Matrizes de correlação ou covariância; Identificação de fatores locais e regionais que conduzem a dinâmica espaço temporal da biodiversidade; Identificação das respostas dos componentes da biodiversidade a distúrbios naturais e antrópicos.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.
Metas	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Criar um banco de dados coeso e relacional. Analisar modelos heurísticos da dinâmica ecológica em sistemas fluvial, lacustre, costeiro e marinho. Modelar a dinâmica de ecossistemas fluvial, lacustre, costeiro e marinho.	Banco de dados relacional; Elaboração de modelos computacionais Padrões e comportamentos de variação espaço-temporais da biodiversidade em sistemas fluvial, lacustre e marinho; Modelo da dinâmica de ecossistemas fluvial, lacustre e marinho; Proposição de cenários temporais (atuais e futuros) para a tomada de decisão e restauração da bacia.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Objetivo Específico 3	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Analisar o comportamento do ecossistema frente a diferentes cenários através de modelagem dinâmica, identificando as características críticas para o funcionamento dos sistemas. Analisar sob a ótica do novo planejamento amostral e parâmetros ambientais mantidos.	Representação esquemática do comportamento dos ecossistemas fluvial, de transição e marinho. Conexão e dependência espaço-temporal dos compartimentos fluvial, lacustre e marinho. Processos ecológicos dos sistemas naturais: status ecológico (cenário atual) e projeção futura frente a cenários pessimistas e otimistas.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.
Metas	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Determinar o componente relacional e estrutural dos compartimentos tróficos e sua dinâmica em sistemas fluviais, lacustres e marinhos Analisar o comportamento do ecossistema frente a diferentes cenários de condições ambientais.	Identificação de distúrbios ambientais sobre a biodiversidade: ocorrência, riqueza, abundância de espécies; Projeções de alterações nas teias tróficas em decorrência a distúrbios e alterações ambientais. Matrizes correlacionais de dados abióticos e bióticos; Simulações em modelagem matemática. Resultados da modelagem dinâmica.	Relatórios técnico-científicos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Objetivo Específico 4	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Integrar o fluxo hidrológico e a dispersão da pluma, bem como sua qualidade, possibilitando a identificação de alterações nos padrões observados em relação aos parâmetros monitorados, influência na biodiversidade aquática e eficácia de medidas de recuperação	Fluxo hidrológico flúvio-marinho integrado à dispersão da pluma identificando o comportamento do ecossistema frente a diferentes cenários. Simulações matemáticas. Predição de efeitos diretos e indiretos sobre o comportamento temporal e do aporte continental nas características hidrogeoquímicas costeiras e marinhas. Predição de cenários futuros do fluxo hidrogeoquímico. Utilização de cenários para possíveis intervenções e recuperação da biodiversidade- cenários de restauração da bacia.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteorológicas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.
Metas	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Variação espaço-temporal do fluxo hidrológico flúvio-marinho; Aspectos hidrogeoquímicos da qualidade da água e sedimento nos sistemas fluvial, lacustre, costeiro e marinho; Caracterização do comportamento da dispersão do aporte fluvial nos ambientes costeiro emarinho	Matrizes correlacionais de dados abióticos e bióticos. Dados geoquímicos de água e sedimento e modelos de dispersão do aporte fluvial.	Relatórios técnico-científicos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteorológicas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Objetivo Específico 5	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Definir locais que podem ser fonte de espécies para o <i>pool</i> regional de espécies da Bacia Hidrográfica do rio Doce e região costeira e marinha adjacente.	Identificação de locais prioritários para a conservação de espécies que auxiliem no plano de manejo, recomposição da biodiversidade e mitigação de danos. Estabelecer conjunto de locais/áreas que devem ser selecionados com o objetivo de representar os principais alvos de recuperação e restauração da biodiversidade, usando princípios de complementaridade e insubstituibilidade.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.
Metas	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Estimar a contribuição de cada local para a diversidade beta (Contribuições Locais para a Diversidade Beta) identificando áreas prioritárias para manutenção. Avaliar as flutuações espaciais na CLDB a partir da resposta média de cada local ao longo do tempo.	Matriz de uso e ocupação da paisagem. Matrizes de diversidade beta locais. Matrizes de correlação entre características ambientais e CLDB. Mapas temáticos com a contribuição proporcional das áreas amostrais para a diversidade beta. Cenários futuros de projeção para conservação e restauração.	Relatórios técnico-científicos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Objetivo Específico 6	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Subsidiar as ações de conservação, reparação, restauração e manejo da biodiversidade aquática, no âmbito da região monitorada, através da modelagem ecossistêmica	Modelo computacional para avaliar fenômenos ambientais. Modelos matemáticos e conceituais de cenários futuros. Modelos conceituais de base para orientação na gestão da restauração e mitigação.	Relatórios técnico-científicos. Banco de dados brutos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.
Metas	Indicadores Verificáveis Objetivamente	Meio de Verificação	Prazo final de entrega	Riscos ou Pressupostos
Determinação do comportamento do sistema, fornecendo uma base para que os tomadores de decisão visualizem cenários de intervenções e consigam gerenciar os ecossistemas de forma mais integrada e participativa.	Modelos ecossistêmicos gerados na plataforma STELLA (Systems Thinking, Experimental Learning Laboratory with Animation). Modelos conceituais de cenários futuros. Modelo computacional para avaliar fenômenos ambientais, compreender os sistemas subjacentes e prever cenários futuros.	Relatórios técnico-científicos.	• Relatório Técnico - Científico Semestral: meses 6 e 15 • Relatório Técnico - Científico Anual e Workshops: meses 10/11 e 21/22	Fatores exógenos (condições meteoceanográficas e hidrológicas) que comprometam a obtenção de dados; Condições de saúde pública; Problemas estruturais das instituições e parceiros envolvidos no projeto.

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

8. Descritivo das Atividades

Ambiente Dulcícola

Tema Dulcícola:

- Biológico - levantamento bimestral e levantamento mensal
- Físico-Químico - levantamento bimestral e levantamento mensal
- Fluxos - levantamento bimestral e levantamento mensal
- Modelagem - levantamento contínuo
- Modificações na bacia - levantamento contínuo

Tema Ictiofauna Dulcícola:

- Macroinvertebrados – levantamento trimestral
- Ictioplâncton – levantamento mensal
- Ecologia de Peixes – levantamento trimestral
- Genética de Peixes – levantamento trimestral

Ambiente Costeiro

Tema Restinga:

- Caracterização estrutural – levantamento trimestral e levantamento semestral
- Composição florística – levantamento trimestral e levantamento semestral

Tema Praia:

- Morfodinâmica de praias – levantamento semestral
- Geoquímica – levantamento semestral
- Monitoramento bentônico – levantamento semestral

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

Tema Manguezal:

- Fisiologia Vegetal – levantamento semestral
- Fauna – levantamento semestral
- Sedimentos e metais – levantamento semestral
- Cartografia e mapeamento de habitats – levantamento semestral

Ambiente Marinho

Tema Marinho:

- Biológico - levantamento trimestral
- Físico-Químico - levantamento trimestral
- Fundos Recifais - levantamento semestral
- Mapeamento de habitats - levantamento contínuo
- Modelagem - levantamento contínuo

Tema Sedimentação Costeira:

- Proveniência Mineral – levantamento trimestral
- Uso de isótopos radiogênicos – levantamento trimestral

Tema Peixes e Crustáceos Marinhos:

- Peixes Estuarinos - levantamento trimestral
- Ecologia Trófica – levantamento semestral e levantamento anual
- Crustáceos - levantamento trimestral
- Peixes Recifais - levantamento bimestral e levantamento anual
- Coletas amostras com pescadores - levantamento contínuo
- Larvas - levantamento semestral
- Telemetria Estuarina – levantamento mensal

Código:		PLANO DE TRABALHO	 FUNDAÇÃO renova
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

Tema Megafauna:

- Tartarugas Marinhas – levantamento semestral e levantamento anual
- Cetáceos – levantamento trimestral e esporádico (encalhes)
- Aves Marinhas – levantamento mensal
- Monitoramento Remoto – levantamento mensal, levantamento trimestral e levantamento anual

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

9. Cronograma das Atividades

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO - GERAL		Legenda:		Levantamento Bimestral			Levantamento Trimestral			Levantamento Semestral			Levantamento Anual			Levantamento Mensal			Período de levantamento			Relatórios e workshops a serem entregues como produtos			Finalização das análises laboratoriais	
TEMAS	ÁREAS	Ano 4			Ano 5												Ano 6			Análises / Workshops			Desmobilização			
		1 (ago22)	2	3	4	5	6 (jan23)	7	8	9	10	11	12 (jul23)	13	14	15	16	17	18 (jan24)	19	20	21	22	23		
Dulcícola	Biológico																									
	Físico-Químico																									
	Fluxos																									
	Modelagem																									
	Modificações na bacia																									
Ictiofauna Dulcícola	Macroinvertebrados																									
	Ictioplâncton																									
	Ecologia de Peixes																									
	Genética de Peixes																									
Marinho	Biológico																									
	Físico-Químico																									
	Fundos Recifais																									
	Mapeamento de habitats																									
	Modelagem																									
Peixes e Crustáceos Marinhos	Peixes Estuarinos																									
	Ecologia trófica																									
	Crustaceos																									
	Censo visual - Peixes Recifais																									
	Coleta de amostras com pescadores para estudos complementares (estuarinos)																									
	Coletas de amostras para genética (recifais)																									
	Larvas																									
	Telemetria estuarina																									

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

10. Equipe do Projeto

Nome	Formação	Instituição	Função no Projeto
Aginaldo Silva Martins	Doutorado em Oceanografia Biológica	UFES	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna Cetáceos
Alessandra Delazari Barroso	Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)	FAESA	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema Fitoplâncton
Alex Cardoso Bastos	Doutorado em Oceanografia Geológica	UFES	Pesquisador ambiente Marinho - tema Sedimentação Marinha
Alexandre Azevedo	Doutorado em Biociências Nucleares	UERJ	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Cetáceos
Ana Cristina Teixeira Bonecker	Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais	UFRJ	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Ictioplâncton
Ana Paula Cazerta Farro	Doutorado em Ciências Biológicas (Genética)	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Cetáceos e ambiente Marinho – tema: Ictiofauna Marinha
Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo	Doutorado em Genética e Melhoramento	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Manguezal
Antelmo Ralpf Falqueto	Doutorado em Fisiologia Vegetal	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Manguezal
Antônio Sérgio Ferreira Mendonça	Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos.	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: avaliação de uso e ocupação do solo da bacia x qualidade da água
Áureo Banhos	Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro- tema: Ictiofauna Dulcícola
Beatrice Padovani Ferreira	Doutorado em Marine Biology	UFPE	Pesquisadora da Avaliação Integrada da Biodiversidade
Carlos Werner Hackradt	Doutorado em Biología de Peces: Aspectos Basicos y Aplicados.	UFSB	Pesquisador ambiente Marinho -tema: Ictiofauna - Peixes Recifais
Claudio de Morisson Valeriano	Doutorado em Geoquímica e Geotectônica	UERJ	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Sedimentação Costeira
Daniel Rigo	Doutorado em Engenharia Oceânica	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Hidrologia e Transporte de Sedimento
Danilo de Lima Camêlo	Doutorado em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas)	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Mineralogia
Diogo Costa Buarque	Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Modelagem Sedimentos
Diolina Moura Silva	Doutorado em Fisiologia Vegetal	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Restinga
Eneida Maria Ezkinazi Sant'Anna	Doutorado em Ecologia	UFOP	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Zooplâncton
Eustáquio Vinícius Ribeiro De Castro	Doutorado em Química	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Modelagem Numérica
Fabian Sá	Doutorado em Geociências (Geoquímica)	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Hidrogeoquímica e Ambiente Costeiro Manguezal
Fabiana Cezar Felix Hackradt	Doutorado em Biologia de Peixes	UFSB	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Ictiofauna - Peixes Recifais

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Nome	Formação	Instituição	Função no Projeto
Felippe Alexandre Lisboa de Miranda Daros	Doutorado em Zoologia	UNESP	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Ictiofauna - Microquímica de Otólitos
Gilberto Fonseca Barroso	Doutorado em Geografia	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Limnologia
Guilherme Tavares Nunes	Doutorado em Oceanografia Biológica	UFRS	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Megafauna: Aves Marinhas
Haydée Andrade Cunha	Doutorado em Genética	UERJ	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Megafauna: Cetáceos
Heitor Evangelista da Silva	Doutorado em Biociências Nucleares	UERJ	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Sedimentação Costeira
Helia Del Carmen Farias Espinoza	Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental	UNIVALI	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Manguezal
Ivoney Gontijo	Doutorado em Ciência do Solo	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Manguezal
Izeni Pires Farias	Doutorado em Ciências Biológicas	UFAM	Pesquisador ambiente Dulcícola - tema Ictiofauna Dulcícola
Jacqueline Albino	Doutorado em Geologia Sedimentar	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Praia
Jean Christophe Joyeux	Doutorado em Oceanografia Biológica	UFES	Pesquisador ambiente dulcícola – tema: Ictiofauna - Ecologia Trófica
Jorge Abdala Dergam	Doutorado em Biologia Animal	UFV	Pesquisador ambiente dulcícola - tema Ictiofauna Dulcícola
José Lailson Brito Junior	Doutorado em Biofísica	UERJ	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Megafauna: Cetáceos
Julien Chiquieri	Doutorado em Ciência Animal	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Ictiofauna - Crustáceos
Karla Gonçalves Costa	Doutorado em Oceanografia Biológica	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Praia
Kyssyanne Samihra Santos Oliveira	Doutorado em Oceanografia Ambiental	UFES	Pesquisador da Avaliação Integrada da Biodiversidade
Leandro Bugoni	Doutorado em Ecology and Evolutionary Biology	FURG	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Aves Marinhas
Leila de Lourdes Longo	Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia)	UFRB	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Bentos de Fundo Inconsolidado
Leonardo Serafim da Silveira	Doutorado em Produção Animal	UENF	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Cetáceos
Luiz Fernando Loureiro Fernandes	Doutorado em Oceanografia	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Zooplâncton
Maikon Di Domenico	Doutorado em Zoologia	UFPR	Pesquisador da Avaliação Integrada da Biodiversidade
Marcelo Renan de Deus Santos	Doutorado em Ecologia de Ecossistemas	Instituto Marcos Daniel - IMD	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Tartarugas Marinhas
Márcio Amorim Efe	Doutorado em Ecologia e Evolução da Biodiversidade	UFAL	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Aves Marinhas
Marco Aurelio Costa Caiado	Doutorado em Biological Systems Engineering.	IFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Modelagem Hidrológica
Maria Tereza Carneiro	Doutorado em Química	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro – tema: Praia
Mauricio Hostim Silva	Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Ictiofauna - Peixes Estuarinos
Mônica Maria Pereira Tognella	Doutorado em Oceanografia Biológica	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro- tema Manguezal

Código:		PLANO DE TRABALHO 
N.º da revisão:		
Elaborador:		
Aprovador:		
Data da aprovação:		
Periodicidade da revisão:		
Classificação:		

Nome	Formação	Instituição	Função no Projeto
Nadson Ressayé Simões	Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais	UFESB	Pesquisador da Avaliação Integrada da Biodiversidade
Oberdan José Pereira	Mestrado em Botânica	UFES	Pesquisador ambiente Costeiro - tema Restinga
Paulo Sérgio Salomon	Doutorado em Aquatic Ecology.	UFRJ	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Fitoplâncton
Renato David Ghisolfi	Doutorado em Physical Oceanography.	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Modelagem Numérica
Renato Rodrigues Neto	Doutorado em Oceanografia Química.	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Hidrogeoquímica e tema manguezal
Rodrigo Leão De Moura	Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia)	UFRJ	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Fundos Recifais
Sarah Maria Vargas	Doutorado em Genética	UFES	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Tartarugas Marinhas
Stefano Zorzal de Almeida	Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema Fitoplâncton
Tatiana Bisi	Doutorado em Ecologia	UERJ	Pesquisador ambiente Marinho - tema Megafauna: Cetáceos
Tomas Hrbek	Doutorado em Ecologia, Evolução e Biologia de População	UFAM	Pesquisador ambiente Dulcícola - tema Ictiofauna Dulcícola
Valéria da Silva Quaresma	Doutorado em Dinâmica Sedimentar	UFES	Pesquisador ambiente Marinho – tema: Sedimentação Marinha
Valéria de Oliveira Fernandes	Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Perifíton
Valquiria Ferreira Dutra	Doutorado em Botânica	UFES	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Macrófitas
Vânia Márcia Duarte Pasa	Doutorado em Química	UFMG	Pesquisador ambiente Dulcícola – tema: Qualidade da água e sedimentos

11. Orçamento sumarizado

#	Rubrica	Valor total
1	Bolsa	R\$ 10.552,200,00
2	Pessoal Vinculado	R\$ 17.986.500,00
3	Pessoal Não vinculado	R\$ 56.662.210,03
4	Equipamento e material permanente importado	R\$ 2.128.688,44
5	Equipamento e material permanente Nacional	R\$ 5.290.743,54
6	Material de consumo Importado	R\$ 708.707,43
7	Material de consumo Nacional	R\$ 14.451.930,56
8	Diária	R\$ 5.718.230,00
9	Passagens e Despesas com locomoção	R\$ 1.042,319,60
10	Embarcação	R\$ 18.288.134,77
11	Despesa com transporte	R\$ 8.411.758,46
12	Serviços de pessoa física	R\$ 1.543.463,00

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

#	Rubrica	Valor total
13	Serviço de pessoa jurídica	R\$ 30.379,397,15
14	Adequação de espaço Físico	R\$ 977.750,00
15	Serviço acessório de importação	R\$ 1.467.567,60
16	Despesa operacional administrativa	R\$ 10.536.5765,03
17	Ressarcimento	R\$ 13.677.796,45
	Total	R\$ 199.823.973,06

12. Contrapartida

- A chancela da Ufes, dada a sua credibilidade;
- As garantias da segurança jurídica e operacional no processo;
- O capital intelectual da Universidade;
- A experiência em atuação em projetos na área objeto da presente proposta;
- A infraestrutura dos laboratórios específicos dos ambientes marinho, costeiro e dulcícola;
- Cessão de espaços diversos para o uso de atividades correlatas ao projeto em epígrafe: bibliotecas, salas de reunião, equipamentos multimídia, entre outros.

13. Critérios de prestação de contas

Relatório	Data de Entrega	Descrição do conteúdo
1º Relatório Trimestral	Entregue no 4º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.
1º Relatório Semestral	Entrega no 6º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Descrição dos resultados inerentes à malha amostral dos parâmetros coletados nos seis meses anteriores de monitoramento dos ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho
2º Relatório Trimestral	Entregue no 6º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.
1º Relatório Anual	Entregue no 10º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Descrição dos resultados inerentes à malha amostral dos parâmetros coletados nos doze meses anteriores dos ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho.
3º Relatório Trimestral	Entregue no 10º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.
Workshop Anual	11º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Apresentação dos resultados do PMBA dos ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho.
2º Relatório Trimestral	Entregue no 10º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

Relatório	Data de Entrega	Descrição do conteúdo
2º Relatório Semestral	Entrega no 15º mês após a assinatura do Termo de Cooperação, Científica e Financeira.	• Descrição dos resultados inerentes a malha amostral dos parâmetros coletados nos últimos seis meses dos ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho.
4º Relatório Trimestral	Entregue no 15º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.
5º Relatório Trimestral	Entregue no 19º mês após a assinatura do Termo de Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.
Relatório Final	Entregue no 21º mês após a assinatura do Termo de Cooperação, Científica e Financeira.	• Descrição dos resultados inerentes a malha amostral dos parâmetros coletados nos vinte e um meses dos ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho.
6º Relatório Trimestral	Entregue no 21º mês após a assinatura do Termo de Cooperação Técnica, Científica e Financeira.	• Acompanhamento físico e financeiro do projeto. • Acompanhamento das análises laboratoriais.
Workshop Anual	Entregue no 22º mês após a assinatura do Termo de Cooperação, Científica e Financeira.	• Apresentação dos resultados do PMBA dos ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho.

Código:		PLANO DE TRABALHO	
N.º da revisão:			
Elaborador:			
Aprovador:			
Data da aprovação:			
Periodicidade da revisão:			
Classificação:			

14. Anexos

#	Anexo	Descrição
1	Anexo I_Plano de Trabalho_modelo Fest_UFES_Dulcícola_Costeiro_Marinho_Integração	Plano de Trabalho desenvolvido para dar continuidade ao Monitoramento da Biodiversidade Aquática na porção capixaba do rio Doce e região marinha e costeira adjacente, com as alterações apresentadas no termo aditivo – N°6 - V.05-21

PLANO DE TRABALHO

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

1.1. Título do Projeto

Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e Costeira Adjacente (PMBA)

1.2. Período de Execução

23 meses (agosto de 2022 a junho de 2024)

1.3. Objetivo Geral

Executar o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA) para os Ambientes Dulcícola (porção capixaba), Costeiro e Marinho da Área Ambiental I, visando dar continuidade à avaliação evolutiva das consequências do aporte de rejeito de mineração oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG) nos ecossistemas aquáticos e na biodiversidade associada, considerando a abordagem técnica da presente proposta. O PMBA será desenvolvido com a malha amostral, frequência e parâmetros indicados nesta proposta, buscando identificar e evidenciar, sob uma ótica de integração de dados, os impactos decorrentes do aporte de rejeito de mineração sobre a biota aquática e seus habitat e monitorá-los, bem como os efeitos de medidas de recuperação que sejam implementadas. Isso será alcançado através dos seguintes objetivos específicos.

1.3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a dinâmica espacial e temporal da biodiversidade aquática e os processos responsáveis por essa dinâmica, constantes deste Plano de Trabalho, considerando a malha e periodicidades indicadas.
- Analisar de forma integrada as tendências espaço-temporais dos ecossistemas alvo do monitoramento, com identificação da sincronia entre comunidades biológicas, resiliência e estabilidade de comunidades biológicas, e interações entre componentes abióticos e bióticos.
- Analisar o comportamento dos ecossistemas frente a diferentes cenários através de modelagem dinâmica, identificando as características críticas para o funcionamento dos sistemas.
- Integrar o fluxo hidrológico e a dispersão da pluma, bem como sua qualidade, possibilitando a identificação de alterações nos padrões observados, influência na biodiversidade aquática e eficácia de medidas de recuperação.
- Definir locais que podem ser fonte de espécies para o pool regional de espécies da Bacia Hidrográfica do rio Doce e região costeira adjacente.

- Subsidiar as ações de conservação, reparação, restauração e manejo da biodiversidade aquática, no âmbito da região monitorada, através da integração de dados e modelagem ecossistêmica.

1.4. Descrição do Plano de Trabalho

O presente documento é composto por 9 seções, que serão organizadas de forma a apresentar as informações sobre o histórico do desenvolvimento do PMBA, as otimizações alcançadas a partir dos resultados e experiências obtidos e o planejamento para os próximos 23 meses de execução do PMBA. Além disso, serão apresentados em Anexo as informações referentes aos Planos de Trabalho individuais dos diferentes temas monitorados pelo PMBA.

Na primeira seção será apresentada a Identificação do Projeto com suas características gerais. A segunda seção apresenta a Descrição do Projeto com informações mais específicas, contendo a contextualização e histórico do surgimento do PMBA, primeiros anos de monitoramento, alterações e melhorias identificadas para o novo ciclo, considerando os resultados e a experiência das equipes nesses 4 anos de monitoramento, bem como a nova estrutura organizacional do PMBA, incluindo a nova vertente de integração inserida no contexto do projeto. Já a terceira seção engloba os resultados esperados, através da abordagem por ambientes, onde pretende-se identificar, evidenciar e monitorar os impactos do rompimento da barragem sobre a biodiversidade nos ambientes estudados. A quarta seção apresenta o cronograma de execução física do PMBA, incluindo os meses de amostragem de campo, análise de dados e entrega de produtos. Por fim, a quinta seção apresenta, no contexto da memória do PMBA, o fortalecimento de base técnico-científica das equipes técnicas envolvidas no monitoramento. A sexta seção apresenta como anexo os Planos de Trabalho individuais dos temas que compõem os ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho, bem como o Plano de Trabalho do tema Avaliação Integrada da Biodiversidade Aquática do Baixo Rio Doce e Área Costeira e Marinha.

2. DESCRIÇÃO DO PROJETO

2.1. Contextualização/Histórico

Em 5 de novembro de 2015, aconteceu no município de Mariana-MG, o rompimento da Barragem de Fundão, barragem de rejeito de minério pertencente à mineradora Samarco e controlada pelas empresas Vale e BHP Billiton. O rompimento provocou uma enxurrada de lama com aproximadamente 62 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério de ferro que atingiu toda a região próxima à barragem e alcançou o leito do rio do Carmo. Após percorrer 22 km no rio do Carmo, a enxurrada de rejeitos chegou no rio Doce ainda em Minas Gerais, alcançando o território capixaba no dia 18 de novembro. Em 21 de novembro, a lama de rejeito alcançou a foz do rio Doce no distrito de Regência, município de Linhares-ES formando uma pluma que se dispersou ao longo da costa do Espírito Santo.

Visando monitorar o impacto na biodiversidade aquática devido a este rompimento, e atendendo à Cláusula 165 do Termo de Transição de Ajustamento de Conduta (TTAC), assinado entre os governos e órgãos reguladores federais e estaduais de Minas Gerais e do Espírito Santo e as empresas Samarco

Mineração S.A. e suas mantenedoras Vale S.A. e BHP Billiton, foi criado o **Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA)**. As diretrizes e orientações para execução do PMBA são ajustadas pelo chamado Termo de Referência 4 (TR4), que prevê ações de reparação e compensação que devem ser feitas de forma centralizada.

Assim, para a execução do PMBA na porção capixaba do rio Doce e áreas costeira e marinha adjacentes, em junho de 2018 foi firmado o Acordo de Cooperação Técnico-Científica e Financeira entre a Fundação Renova (Fundação criada para gerir e executar as medidas de recuperação dos danos resultantes do rompimento da barragem de Fundão) e a Fundação Espírito-Santense de Tecnologia (Fest). Desde então, pesquisadores de 27 universidades, colaborativamente, têm executado o monitoramento dos parâmetros ambientais relacionadas aos impactos causados pelo rompimento da barragem de Fundão na biodiversidade aquática. A área de atuação do PMBA, definida pelo TR4, compreende ambientes continentais (rios, lagos e lagoas), costeiros (praias, manguezais e restingas) e marinhos (estuário e mar), contemplando a porção capixaba da bacia hidrográfica do rio Doce e faixa marítima de Guarapari (ES) até Abrolhos (BA). O programa foi constituído com o objetivo de realizar o monitoramento de parâmetros e indicadores bióticos e abióticos além de avaliar o habitat de fundo marinho, a qualidade da água e a ecotoxicidade, ou seja, o potencial tóxico de contaminação por metais nos compartimentos abióticos (sedimentos, água, temperatura, luz, etc.) e organismos vivos. O agrupamento desses parâmetros leva ao entendimento sobre os impactos causados no ecossistema e na biodiversidade.

O PMBA iniciou suas atividades de campo em setembro de 2018, tendo a sua configuração inicial dividida em oito grandes áreas temáticas (chamadas de Anexos) nos três ambientes estudados: dulcícola, costeiro e marinho. Como primeiro produto técnico do PMBA, foi elaborado um relatório utilizando dados pretéritos à sua execução, que avaliou e consolidou as pesquisas e os trabalhos anteriores ao desastre (ou mesmo após o desastre, mas anteriormente à execução do PMBA), permitindo a produção de um diagnóstico abrangente em relação às mudanças causadas pelo impacto e como essas informações se relacionariam com os dados a serem coletados no PMBA.

Em setembro de 2019 o PMBA iniciou um novo período do monitoramento, denominado Período de Transição, em que foram estabelecidas algumas alterações de malha e frequência amostral visando o aperfeiçoamento do monitoramento (Ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio). Esse momento foi estabelecido pela Câmara Técnica de Conservação e Biodiversidade (CTBio) buscando evitar qualquer tipo de interrupção do programa de monitoramento realizado até então pela Fundação Espírito-Santense de Tecnologia (FEST) através da Rede Rio Doce Mar (RRDM), pois considerou ser necessária a realização de uma revisão do escopo do TR4. O Período de Transição foi inicialmente planejado para durar 04 (quatro) meses, o que não aconteceu em função da situação sanitária de pandemia da COVID-19 que se instaurou já no início de março de 2020 e impossibilitou a atuação dos órgãos competentes na referida revisão de escopo. Desta forma, as alterações aprovadas pela CTBio, majoritariamente relacionadas à malha e frequência amostrais, foram executadas até julho de 2022.

Desde o início das campanhas de coleta de dados pelo PMBA, a única interrupção de coletas ocorreu devido à situação sanitária imposta pela pandemia da COVID-19, que inviabilizou as atividades de

campo de março de 2020 a dezembro de 2020. Durante este período, apenas atividades possíveis na forma de teletrabalho foram mantidas. O retorno das atividades presenciais foi condicionado à implementação de protocolos de biossegurança para enfrentamento da pandemia.

Em julho de 2022 foi assinado um aditivo ao Acordo de Cooperação Técnico-Científico previamente assinado entre Fundação Renova e Fest em 2018, em que, afim de otimizar os esforços do monitoramento e utilizando a expertise das equipes adquirida ao longo dos anos, alterando pela primeira vez o escopo técnico do monitoramento com a ciência e aprovação dos órgãos ambientais, contemplando o Novo Ciclo do PMBA.

2.2. Estrutura do Novo Ciclo do PMBA

Para o Novo Ciclo do PMBA foram propostos ajustes técnicos de malha e frequência amostrais. Estas sugestões foram capitaneadas pela equipe técnica do PMBA, visando a otimização das análises após 4 anos da execução do monitoramento na região afetada, sob total adesão aos objetivos propostos. Levou-se em consideração, para tanto, a expertise dos profissionais, os conhecimentos desenvolvidos ao longo dos anos de monitoramento e os cenários temporais e espaciais obtidos, que justificaram os ajustes à malha e frequência amostral.

As alterações sugeridas pela equipe para o Novo Ciclo do PMBA foram alinhadas junto à Fundação Renova e apresentadas para avaliação da Câmara Técnica de Biodiversidade (CTBio), que as aprovou, conforme Ofício SEI nº 30/2022-CTBio/DIBIO/ICMBio e Ofício SEI nº 46/2022-CTBio/DIBIO/ICMBio.

O formato proposto para o Novo Ciclo do PMBA terá uma abordagem integrada por Ambientes (e não mais por Anexos). Esta abordagem permitirá implementar, dentro do presente Plano, a interação entre os diversos componentes da biodiversidade e os ecossistemas, através de uma avaliação contínua de todas as informações geradas e mantidas, permitindo também uma gestão mais eficiente no compartilhamento de dados e na estrutura das diversas áreas de conhecimento.

Cada ambiente será abordado em temas e subtemas, nos quais as diferentes áreas do conhecimento deverão interagir sob perspectivas teórico-práticas de integração dos dados, avaliando a sincronia espacial e dinâmica da biodiversidade, com análises confirmatórias e de sistemas ecológicos dinâmicos, identificação da relação espécie-ambiente e de impactos ambientais, além de identificar locais prioritários para auxiliar no plano de manejo, mitigação e recuperação de danos aos ecossistemas.

O Programa de Monitoramento para os Ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho compreende áreas de conhecimento específicas, conforme o tipo de estudo, ambiente ou grupo de organismos contemplados no Termo de Referência 4 - Primeira Revisão. Os temas que serão executados estão listados a seguir:

AMBIENTE DULCÍCOLA:

Coordenação: Profa. Eneida Eskinazi Sant'Anna

1- Abiótico – Limnologia e Geoquímica da Água e Sedimento

1.1 - Água: parâmetros limnológicos (alcalinidade, carbono orgânico dissolvido, clorofila-a, condutividade, oxigênio dissolvido, pH, temperatura, entre outros). Geoquímica metais-(dissolvidos, totais, particulado), nutrientes; Material Particulado em Suspensão (MPS); Mineralogia;

1.2 - Sedimento (superficial): Geoquímica Metais (totais); compostos orgânicos (pesticidas, PCBs, fenóis totais e HPAs), nutrientes; elementar (C,N); Sedimentologia e Mineralogia.

2- Fluxos e Relações com Atividades na Bacia

2.1 - Modelagem computacional para caracterização hidrológica e avaliação do fluxo de água e sedimentos; dinâmica de populações e comunidades. Padrões espaciais e temporais da biodiversidade;

2.2 - Monitoramento de vazões, descargas sólidas e quantificação de fluxos de metais e nutrientes;

2.3 - Análise das relações de causa e efeito de ações na bacia hidrográfica sobre fluxos de água, sedimentos e nutrientes.

3- Biótico – Comunidades aquáticas (estrutura, biomassa, padrões espaço-temporais e índices integrativos)

3.1 – Plâncton (Fitoplâncton, Zooplâncton e Ictioplâncton);

3.2 – Macrófitas aquáticas;

3.3 – Perifíton;

3.4 – Macroinvertebrados;

3.5 - Ecologia de Peixes;

3.6 - Genética de Peixes.

AMBIENTE COSTEIRO:

Coordenação: Jacqueline Albino

1 - Restinga

1.1 - Caracterização estrutural superficial e subterrânea em diferentes fitofisionomias da vegetação;

1.2 - Composição florística superficial e subterrânea em diferentes fitofisionomias da vegetação;

1.3 – Determinação de contaminantes no solo, aerossol marinho e tecidos vegetais.

2 - Praias

2.1 - Morfodinâmica de praias;

2.2 - Geoquímica;

2.3 - Monitoramento bentônico.

3 - Manguezal

3.1 - Fisiologia Vegetal;

3.2 - Fauna;

3.3 - Sedimentos e metais;

3.4 - Cartografia e mapeamento de habitats.

AMBIENTE MARINHO:

Coordenação: Prof. Stefano Zorzal de Almeida

1- Abiótico

1.1 - Modelagem computacional do transporte de sedimentos finos;

1.2 - Água: Hidrogeoquímica Metais (dissolvidos, totais, particulado), compostos nitrogenados, nutrientes; Material Particulado em Suspensão (MPS);

1.3 - Sedimento (superficial e coluna sedimentar): Geoquímica Metais (parcial); compostos orgânicos, nutrientes; Sedimentologia e Mineralogia Isótopos e elementar CN;

1.4 - Mapeamento de Habitats: Imageamento do fundo de áreas específicas - MultiBeam, Dropcameras;

1.5 - Sedimentação Costeira: Proveniência Mineral e Uso de isótopos radiogênicos de Sr/Nd.

2- Biótico

2.1 – Plâncton:

Fitoplâncton e bacterioplâncton – micro, nano e picoplâncton (Análise quali-quantitativa; Biomassa fitoplanctônica; Estado fisiológico; Índices ecológicos; Sequenciamento genético (metabarcoding);

Zooplâncton: Análise quali-quantitativa; Biomassa zooplânctônica; Estrutura da comunidade; Índices ecológicos;

Ictioplâncton: Análise quali-quantitativa; Ovos e larvas de peixe; Estrutura da comunidade; Distribuição espacial das assembleias; Índices ecológicos.

2.2 - Fundos consolidados:

Recifes e bancos de rodolitos: Dinâmica de comunidades bênticas; Saúde de corais.

2.3 - Bentos de fundo inconsolidado:

Taxonomia e quantificação de organismos; Estruturas das comunidades; Distribuição dos organismos.

2.4 - Ictiofauna e Crustáceos Marinhos:

- Peixes Recifais: estrutura populacional e descritores de comunidade biológica das assembleias de peixes recifais (através de censos visuais subaquáticos);
- Peixes e Crustáceos Estuarinos: estrutura populacional e descritores de comunidade biológica das assembleias de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos (através de arrastos de fundo).
- Genética: genética de populações e análise de *barcoding*;
- Ecologia Trófica: hábitos alimentares e isótopos estáveis;
- Reprodução de peixes e crustáceos: espécies mais abundantes/frequentes e de interesse comercial e/ou ecológico;
- Larvas de peixes: assentamento e recrutamento de peixes marinhos (através de armadilhas de luz ao longo da costa do ES e BA em frente à foz dos rios Mucuri, São Mateus, Doce e Piraquê-Açu);
- Microquímica de Otólitos: microquímica de otólitos de peixes estuarinos/marinhos de interesse comercial e/ou ecológico;
- Telemetria: Peixes Estuarinos e Marinhos: peixes de interesse comercial e/ou ecológico dos rios São Mateus e Doce.

2.5 - Megafauna - Tartarugas marinhas:

- Diversidade genética e de parâmetros genéticos-populacionais;
- Avaliação da saúde.

2.6 - Megafauna - Cetáceos:

- Uso do habitat;
- Encalhes nas praias do litoral do Espírito Santo;
- Diversidade genética;
- Histopatologias;

- Análise de contaminantes;
- Estimativa da idade, maturação e taxa de fecundidade;
- Ecologia trófica a partir de isótopos estáveis;
- Interação dos pequenos cetáceos com a pesca.

2.7 - Megafauna - Aves marinhas:

- Distribuição espacial e uso das áreas impactadas;
- Recursos alimentares;
- Contaminação;
- Demografia e reprodução;
- Diversidade genética.

2.8 - Megafauna - Monitoramento Remoto da Megafauna Marinha

- Dronemonitoramento costeiro;
- ROV's.

2.3. Avaliação Integrada da Biodiversidade Aquática do Baixo Rio Doce e Área Costeira e Marinha:

Ao longo dos 4 anos de execução do PMBA, as equipes técnicas apresentaram resultados que indicaram impactos observados a curto, médio e longo prazo nos diversos componentes da biodiversidade e nos serviços ecossistêmicos. A equipe de Avaliação Integrativa da Biodiversidade analisará este conjunto de dados, objetivando o planejamento para as estratégias de comunicação e integração entre os projetos, para compreensão dos dados e dos principais resultados. A partir desta etapa, será possível a proposição de modelos teóricos que acessem o nexo causal associado à dinâmica ecossistêmica e da biodiversidade, a simulação das respostas integradas transversais aos habitat alvos do monitoramento, consolidando a análise evolutiva e a síntese dos principais resultados, dos cenários propostos e perspectivas futuras.

Diante do grande volume de dados e análises geradas desde o início do PMBA, a presente proposta busca aplicar uma abordagem de síntese ecológica buscando uma otimização da organização e integração dos resultados multi-grupo e as interações existentes entre os diversos componentes da biodiversidade e os ambientes, bem como seu significado para uma melhor compreensão por parte de gestores e tomadores de decisão.

Nesse contexto, o escopo deste projeto contempla a realização da Modelagem de Ecossistemas Aquáticos utilizando como ferramenta principal o uso combinado de Modelos Conceituais e a Análise de Dados Ambientais primários e secundários. O uso de tais abordagens fornecerá um conhecimento

profundo sobre as interações ecológicas observadas na área monitorada, bem como um maior entendimento das alterações ambientais ocasionadas pelos estressores ambientais presentes na área de estudo, sempre atentando às possibilidades de estimativas de biodiversidade anteriores ao impacto através de dados anteriores ao impacto, ou através do uso de controles adequados. Além disso, possibilitará a construção de modelos preditivos mais robustos. Ademais, a elaboração de Modelos de Ecossistemas facilita a avaliação da cadeia de impactos monitorados pelo Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, permitindo uma interpretação mais clara dos processos dinâmicos pelo público técnico e não-técnico.

O Plano de Trabalho contendo as informações detalhas acerca da atuação da equipe de Avaliação Integrativa da Biodiversidade encontra-se como anexo ao presente documento.

3. RESULTADOS GERAIS ESPERADOS

Através da abordagem por ambientes, conjuntamente com a estrutura de integração proposta, pretende-se identificar, evidenciar e monitorar os impactos do rompimento da barragem de Fundão sobre a biodiversidade nos ambientes dulcícola, costeiro e marinho que serão monitorados no escopo deste Plano proposto. Dessa forma são esperados os seguintes resultados gerais:

- Registro de padrões e comportamentos de variação temporal da biodiversidade de sistemas fluviais e lacustres do baixo Rio Doce, costeiro e região marinha, para criar modelos holísticos da dinâmica destes sistemas, permitindo assim entender o funcionamento destes ecossistemas de uma maneira integrada;
- Identificação dos ambientes mais impactados pelo rompimento, bem como aqueles com maior capacidade de resiliência aos efeitos antrópicos, caracterizando as principais forças direcionadoras e características críticas destes ecossistemas;
- Identificação de dinâmicas regionais ou idiossincráticas no comportamento da biodiversidade, e principalmente, criar cenários de intervenções bem como projeções para a biodiversidade do Baixo Rio Doce e regiões costeira e marinha, em função das estratégias de manejo;
- Sugestão de locais que devem ser considerados prioritários nas estratégias de manejo destes ecossistemas, por serem ambientes fonte de espécies para o *pool* regional de espécies da Bacia Hidrográfica e regiões costeira e marinha adjacente;
- Geração de subsídios para os tomadores de decisão intervirem na implementação de estratégias de planejamento e conservação da biodiversidade através das informações dos modelos técnico-científicos gerados.

4. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO FÍSICA

O cronograma de execução física é apresentado em linhas macro, com os períodos de desenvolvimento das principais atividades do Programa, bem como os marcos de entrega de produtos, tais como Relatórios e Workshops (Quadro 1).

Quadro 1: Cronograma de execução física

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO - GERAL		Legenda:		Levantamento Bimestral			Levantamento Mensal																					
				Levantamento Trimestral			Período de levantamento																					
		Levantamento Semestral	Relatórios e workshops a serem entregues como produtos																									
		Levantamento Anual	Finalização das análises laboratoriais																									
TEMAS	ÁREAS	Ano 4			Ano 5															Ano 6			Análises / Workshops			Desmobilização		
		1 (ago22)	2	3	4	5	6 (jan23)	7	8	9	10	11	12 (jul23)	13	14	15	16	17	18 (jan24)	19	20	21	22	23				
Dulcícola	Biológico																											
	Físico-Químico																											
	Fluxos																											
	Modelagem																											
Ictiofauna Dulcícola	Modificações na bacia																											
	Macroinvertebrados																											
	Ictioplâncton																											
	Ecologia de Peixes																											
Marinho	Genética de Peixes																											
	Biológico																											
	Físico-Químico																											
	Fundos Recifais																											
Peixes e Crustáceos Marinhos	Mapeamento de habitats																											
	Modelagem																											
	Peixes Estuarinos																											
	Ecologia trófica																											
	Crustáceos																											
	Censo visual - Peixes Recifais																											
	Coleta de amostras com pescadores para estudos complementares (estuarinos)																											
	Coletas de amostras para genética (recifais)																											
Larvas																												
Costeiro	Telemetria estuarina																											
	Restinga																											
	Praia																											
	Manguezal																											
Sedimentação Costeira																												
Megafauna	Sobrevoos e ROVs																											
	Tartarugas Marinhas																											
	Cetáceos																											
	Aves Marinhas																											
Entregas																												
PLANO DE TRABALHO																												
RELATÓRIO TRIMESTRAL																												
RELATÓRIO SEMESTRAL																												
RELATÓRIO / WORKSHOP ANUAL																												

5. EXPERIÊNCIA NO PMBA, FORTALECIMENTO DE BASE TÉCNICO-CIENTÍFICA E CREDIBILIDADE

- Experiência comprovada no desenvolvimento do PMBA, geração e difusão de conhecimento, formação de recursos humanos nos temas do PMBA e histórico de pesquisas realizadas na região.

A Equipe Técnica Principal, responsável pela execução, possui competência nas diversas áreas de conhecimento relacionadas ao Programa de Monitoramento e experiência em termos de atuação profissional na Área Ambiental I. A maior parte dos pesquisadores indicados já desenvolve atividades no desenvolvimento do atual PMBA desde 2018. Os grupos de pesquisa associados possuem estudos em desenvolvimento e publicações sobre os sistemas dulcícola, costeiro e marinho e sua biodiversidade, além de dados pretéritos que servirão para análises referentes aos impactos crônicos na biodiversidade. Por um lado, a referida experiência presente na Equipe Técnica proporcionará qualidade e credibilidade aos produtos esperados e ao seu processo de desenvolvimento; por outro lado, o Programa de Monitoramento proporcionará a esses grupos de pesquisa, entre outros: oportunidade de aplicação de conhecimentos produzidos; e visibilidade junto a órgãos gestores ambientais e à sociedade como um todo.

- Criação de conhecimento e estruturação local para responder ao evento atual a longo prazo.

Os impactos ambientais resultantes dos rejeitos de mineração incitam processos de recuperação e mitigação que requerem a criação de competências, seja pela dimensão e diversidade dos impactos, seja pelo caráter inter e transdisciplinar das alternativas de solução. Esse é um aspecto de grande diferencial do presente Plano, que foca tanto na execução do Programa de Monitoramento, como na criação de expertise para responder ao evento atual a longo prazo. No que se refere a esse último aspecto, utiliza-se de mecanismos de capacitação interna à própria Equipe Técnica (pesquisadores, alunos/pesquisadores, apoios técnicos, etc.) e externa (representantes da Fundação Renova e de órgãos gestores ambientais).

Em termos de estruturação local para responder ao evento atual a longo prazo, a execução do Programa de Monitoramento contribui muito nesse sentido. Alguns exemplos:

- Em função da demanda de trabalho, algumas instituições e grupos de pesquisa atualmente envolvidos na execução do PMBA tiveram a adequação de espaços físicos voltados para: o armazenamento de amostras e a realização de análises laboratoriais; e a acomodação das equipes técnicas atuando no PMBA;
- Da mesma forma, uma série de equipamentos foram adquiridos com a finalidade de viabilizar: as análises laboratoriais; o levantamento de dados em campo; o armazenamento de dados e informações em repositórios; e para processamento e análise de dados propriamente ditos.
- Parte da Equipe Técnica é composta de professores, graduandos, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos, de forma que a execução do Programa de Monitoramento muito contribui para a formação e aperfeiçoamento de pessoal.

- Credibilidade e transparência dos dados para a sociedade:

A Equipe Técnica responsável pela execução do Projeto é constituída essencialmente por membros de instituições acadêmicas e/ou de pesquisa ou a elas vinculados, que têm na sua independência e expertise a credibilidade necessária para executar os estudos de monitoramento e avaliação previstos no Programa de Monitoramento. A Equipe Técnica dispõe de pesquisadores e pessoal técnico-científico especializados e/ou com atuação em gestão de dados ambientais / de biodiversidade e em comunicação socioambiental que oferecerão subsídios, no âmbito do Programa de Monitoramento, para que a Fundação Renova ofereça, aos órgãos gestores ambientais e à sociedade, transparência e acesso aos dados levantados e gerados e a informações produzidas; também em linguagem acessível a públicos diversos, especialmente ao público geral.

6. ANEXOS

Os anexos que compõem este documento são:

- Ambiente Dulcícola;
- Ambiente Costeiro;
- Ambiente Marinha;
- Avaliação Integrada da Biodiversidade Aquática do Baixo Rio Doce e Área Costeira e Marinha.

ANEXO

AMBIENTE DULCÍCOLA

SUMÁRIO

SUMÁRIO EXECUTIVO.....	16
BACIA INTEGRAÇÃO - REFLEXOS DE AÇÕES NA BACIA DO DOCE NOS SISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAL E MARINHO	18
LIMNOLOGIA ABIÓTICA	35
MINERALOGIA.....	44
GEOQUÍMICA.....	50
MACRÓFITAS AQUÁTICAS	60
PERIFÍTON	68
FITOPLÂNCTON	77
ZOOPLÂNCTON.....	82
ICTIOPLÂNCTON.....	91
MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS.....	102
ICTIOFAUNA	113

SUMÁRIO EXECUTIVO – AMBIENTE DULCÍCOLA

A abordagem considerada no Novo Ciclo do PMBA foi planejada sob uma ótica de integração entre os ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho, permitindo maior fluidez na prospecção e aproximação de dados, consolidando a construção de cenários preditivos. O monitoramento do ambiente Dulcícola do PMBA aplica abordagens complementares que envolvem a modelagem analítica dos fluxos de água e sedimento, a avaliação das intervenções realizadas na região da bacia hidrográfica e o monitoramento de aspectos abióticos e bióticos da porção capixaba da bacia do Rio Doce até a sua desembocadura no Oceano Atlântico em Regência (Linhares). O ambiente Dulcícola engloba o monitoramento em 11 temas, sendo eles: Bacia Integração (Fluxo de Sedimentos, Uso e Ocupação da Bacia e Modelagem), Limnologia, Geoquímica, Mineralogia, Macrófitas Aquáticas, Perifíton, Fitoplâncton, Zooplâncton, Ictioplâncton, Macroinvertebrados Bentônicos e Ictiofauna.

A partir da detecção da dinâmica de contaminantes observada nos três primeiros anos do PMBA, fundamentalmente associada ao pulso sazonal de chuvas, foi estabelecido um novo recorte temporal nas campanhas amostrais. Assim, para o tema Bacia Integração (Uso e Ocupação da Bacia e Modelagem), a frequência amostral foi estabelecida como contínua; para Fluxo de Sedimentos, mensal no período chuvoso (outubro a março) e coleta única no período seco. Já para os temas Limnologia, Geoquímica, Mineralogia, Macrófitas Aquáticas, Perifíton, Fitoplâncton e Zooplâncton, a frequência amostral foi estabelecida como mensal no período chuvoso (outubro a março), e bimestral no período seco (abril a setembro). Para o tema Ictioplâncton, por sua vez, a frequência amostral foi estabelecida como mensal. Por fim, para os temas Macroinvertebrados Bentônicos e Ictiofauna, o monitoramento será realizado trimestralmente.

Quanto ao recorte espacial, as amostragens na bacia do rio Doce vão de Resplendor – MG até a foz, em Linhares, porém, a malha amostral não é única para todos os temas do ambiente. As malhas amostrais dos diferentes temas são adotadas de acordo com as especificidades dos mesmos. Para os temas Limnologia, Geoquímica, Mineralogia, Macrófitas Aquáticas, Perifíton, Fitoplâncton e Zooplâncton, a malha amostral foi ampliada com a inclusão de dois reservatórios no trecho de Minas Gerais do Rio Doce (Aimorés e Mascarenhas), reconhecidos como ecossistemas-chave na dinâmica temporal de contaminantes e comunidades biológicas na bacia do Rio Doce. Houve ainda a adição de um ponto amostral à montante do reservatório de Aimorés e do novo ponto fluvial controle (Rio Manhuaçu), com o objetivo de possibilitar a detecção do efeito da cascata de reservatórios (Aimorés e Mascarenhas) na dinâmica biológica e de contaminantes na calha do Rio Doce. A seleção do novo ponto amostral controle (Rio Manhuaçu) foi necessária em função do alto grau de impacto no Rio Guandu (ponto controle anterior), resultante do intenso uso e ocupação da sua área de drenagem. Em

relação aos ecossistemas lacustres, foi incorporado à malha amostral o Lago Palmas (o mais profundo lago do Brasil), para que a dinâmica de contaminantes possa ser avaliada em condições ecossistêmicas que favorecem o alto tempo de residência no ambiente lacustre, devido ao processo de estratificação térmica e química do lago. A lagoa Cacimbas foi adicionada à malha amostral em substituição à lagoa Areão, em razão da inviabilidade de acesso. Já para os temas Ictioplâncton, Macroinvertebrados Bentônicos e Ictiofauna, foi excluída a estação amostral de Córrego São Pedro Frio/Colatina-ES e incluídas as estações de Rio Guandu/Baixo Guandu-ES e Rio Manhuaçu/Aimorés-MG.

As particularidades de cada tema serão apresentadas nos planos de trabalho a seguir, onde os dados abióticos servirão de subsídio para a interpretação dos resultados dos demais temas do ambiente, que poderão ser analisados de forma integrada a fim de discutir as variações sazonais e respostas sobre os parâmetros bióticos.

BACIA INTEGRAÇÃO - REFLEXOS DE AÇÕES NA BACIA DO DOCE NOS SISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAL E MARINHO

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Daniel Rigo	Pesquisador líder da linha de ação “Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce”	UFES
Antonio Sérgio Ferreira Mendonça	Pesquisador Líder da linha de ação “Caracterização e análise de interações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática”	UFES
Marco Aurélio Caiado	Pesquisador Líder da linha de ação Caracterização hidrológica global para compreensão dos aportes de água doce e de sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce.	IFES
Diogo Buarque	Pesquisador da linha de ação Caracterização hidrológica global para compreensão dos aportes de água doce e de sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce.	UFES
Mônica de Souza Mendes	Profissional Sênior	UFES
Sebastião Francisco Teixeira	Profissional de campo	UFES
Lorena Frasson Loureiro	Bolsista Pessoal Vinculado	UFES
Livia Luchi Rabello	Pesquisador Junior	IFES
Izabela Tavares Spnagol	Pesquisador Junior	UFES
Selena Lopes Carvalho	Pos doc (linha de ação Caracterização e análise de interações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática)	UFES
A contratar	Pós Doc	UFES
A contratar	Iniciação Científica (linha de ação Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce)	UFES
A contratar	Iniciação Científica (linha de ação Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce)	UFES
A contratar	Iniciação Científica linha de ação Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce)	UFES
A contratar	Iniciação Científica (linha de ação Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce)	UFES
A contratar	Iniciação Científica (linha de ação Caracterização e análise de interações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática)	UFES
A contratar	Iniciação Científica (linha de ação Caracterização e análise de interações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática)	UFES

2. ESCOPO

O Projeto Bacia Integração – reflexos de ações na bacia do rio Doce nos sistemas aquáticos continental e marinho – é constituído de três linhas de ação relacionadas ao entendimento da conectividade dos sistemas fluvial-estuarino e marinho. Para isso foram previstas a modelagem hidrossedimentológica da bacia do Rio Doce, o monitoramento da vazão e das descargas de água, sedimentos, nutrientes e elementos traço e a análise de ações no território da bacia.

Embora cada linha de ação tenha seus objetivos e metas específicas, no conjunto, elas buscam oferecer subsídios para o desenvolvimento de análises integradas sobre o nível de exposição da biodiversidade aquática, dulcícola e marinha, aos efeitos deletérios dos rejeitos de minério considerando a magnitude dos fluxos hidrosedimentológicos.

Anteriormente, o monitoramento dos fluxos estabeleceu uma linha base de referência que auxiliou os demais projetos a compreender mudanças no comportamento de suas variáveis e parâmetros. O monitoramento de ações desenvolvidas na bacia hidrográfica, auxiliou na compreensão dos efeitos destas ações sobre aspectos de quantidade/qualidade de água e biodiversidade, bem como de fluxos de água, sedimento e nutrientes.

A seguir são apresentados os escopos das referidas linhas de ação:

- **Caracterização hidrológica global para compreensão dos aportes de água doce e de sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce**

Esta linha de ação é composta por três escopos: (1) Obtenção de dados de precipitação e de vazão monitorados ao longo de toda a bacia do rio Doce visando a análise do comportamento hidrológico da mesma; (2) Simulação contínua e espacialmente distribuída das vazões e; (3) Simulação da produção de sedimentos na bacia do rio Doce e do transporte de sedimentos na calha do rio principal, de forma contínua. Esses escopos visam a subsidiar a interpretação dos resultados das análises toxicológicas e de qualidade de água, identificando a percentagem de vazão oriunda de cada sub-bacia que compõe a bacia do rio Doce, bem como quantificando os sedimentos que tem origem na erosão das encostas e na ressuspensão de material de fundo.

O estudo da ressuspensão se faz de grande importância porque, durante eventos de cheia, o fluxo de sedimentos no rio tende a aumentar devido à ressuspensão de material presente no leito, vindo a ampliar as concentrações de material particulado em suspensão, de nutrientes, matéria orgânica e elementos traço para além das concentrações oriundas da produção das encostas (via erosão e escoamento superficial). Serão realizadas simulações de cenários de eventos extremos de vazão, assim como de realização de ações no leito do rio Doce como desassoreamento de reservatórios, obras de dragagem e outras.

- **Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce**

O aporte de água doce modifica o padrão de escoamento, a disponibilidade de nutrientes e sedimentos na área costeira adjacente. Devido à sazonalidade dos eventos de vazão, ocorre maior fluxo de água doce nos períodos úmidos, entre outubro e março na região de estudo, e menor fluxo de água no período seco, entre abril e setembro.

No caso do Rio Doce, cuja vazão média anual é de $983 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, ocorre interferência na hidrodinâmica na região localizada próxima à sua foz, além desse rio contribuir significativamente com o aporte de sedimentos (OLIVEIRA et al, 2018), nutrientes e contaminantes (i.e., elementos traços). Cabe observar que, em períodos úmidos, os valores de vazões médias mensais podem ser muito superiores à vazão média anual e, conseqüentemente, mais elevados os valores de cargas aportadas ao trecho final do rio e lançados no mar.

Uma abordagem mais geral de fluxos hidrológicos, sejam de água, sedimento, nutrientes e contaminantes (i.e., elementos traço), advindos do continente, tem sido reconhecida como importante abordagem biogeoquímica para análise integrada de águas costeiras (CROSSLAND et al., 2005; BARROSO et al., 2012; MILLIMAN; FARNSWORTH, 2011; TONG et al., 2015).

Para costa leste do Brasil os Rios São Francisco e Doce são os maiores tributários de água doce, sendo que o segundo rio contribui com o maior aporte de sedimentos (SOUZA; KNOPPERS, 2003; MILLIMAN; FARNSWORTH, 2011). Estudos desenvolvidos anteriormente descrevem a bacia do Rio Doce com alta produção de sedimentos. Lima et al. (2006) analisaram dados de descargas sólidas de sedimentos suspensos em grandes rios brasileiros e concluíram que a estação localizada em Colatina, no Rio Doce, apresentou o segundo maior fluxo de sedimentos ($148 \text{ t} \cdot \text{km}^{-2} \cdot \text{ano}^{-1}$), ficando atrás somente do rio Amazonas ($168 \text{ t} \cdot \text{km}^{-2} \cdot \text{ano}^{-1}$).

O maior fluxo de sedimentos pode estar relacionado à maior disponibilidade de nutrientes, necessários para o desenvolvimento das comunidades aquáticas de produtores primários. Por outro lado, o incremento do material particulado em suspensão tende a reduzir a transparência da água, devido ao aumento de turbidez, interferindo em processos fotossintéticos. Estimativas de descargas sólidas auxiliam na análise de dados relativos à vida de espécies aquáticas existentes na região de estudo.

Desse modo, torna-se necessária a quantificação de vazões e de fluxo de sedimentos, nutrientes e contaminantes (i.e., elementos traço) no Rio Doce, em trecho localizado mais próximo à foz, e livre da intrusão salina, com finalidade de subsidiar a análise de dados de pesquisadores da área biológica, auxiliando na caracterização do ambiente estudado.

Os fluxos serão considerados em base anual (m^3/ano para água ou kg/ano para materiais) baseado em amostragens. Os dados brutos e produtos esperados contemplam a variação espaço-temporal, bem como a avaliação da relação flúvio-marinha, como descritos nos itens a seguir. Os resultados da linha de ação permitirão avaliar o nível de exposição da biota aquática, estuarina e marinha, em relação aos efeitos deletérios dos rejeitos de minério. Também será possível avaliar a significância dos fluxos de nutrientes e elementos traço comparado a outras bacias hidrográficas.

Caracterização e análise de interrelações envolvendo ações na bacia hidrográfica, e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática

Esta linha de ação tem como escopo a identificação, o mapeamento e o acompanhamento de ações realizadas sobre o território delimitado pela bacia hidrográfica do Rio Doce como respostas da Fundação Renova ao rompimento da barragem de Mariana, visando subsidiar a compreensão dos efeitos destas ações sobre aspectos de quantidade/qualidade de água e biodiversidade, bem como de fluxos de água, sedimento e nutrientes. Dentre as atividades a serem desenvolvidas estão: a realização de visitas técnicas à área de estudo; o acompanhamento de reuniões de Câmaras Técnicas do Comitê Interfederativo (CIF), especialmente da CT-Bio, CT-Flor, CT-SHQA e CT-Rejeitos relacionadas com os objetivos da presente linha de ação; o acompanhamento de reuniões do Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (CBH Doce) de interesse; bem como a realização de visitas técnicas à AGEVAP e à Fundação Renova.

Será desenvolvida análise de interrelações envolvendo ações de resposta na bacia (incluindo Restauro florestal, Recuperação de Nascentes e de Áreas de Preservação Permanente, Esgotamento Sanitário e Recuperação do Reservatório Risoleta Neves) e aspectos relativos à quantidade/qualidade de água e biodiversidade aquática. Em um contexto mais geral, serão analisadas interrelações destes aspectos com alterações de uso e ocupação do solo relacionadas com atividades de agricultura, pecuária, mineração, dentre outras.

Será realizada modelagem das contribuições pontuais de esgoto doméstico oriundas dos municípios que compõem o Programa 31 - “Coleta e Tratamento de Esgoto e Destinação de Resíduos Sólidos”, da Fundação Renova, seguido da otimização do lançamento destas cargas, para identificação de eficiências mínimas de tratamento necessárias ao atendimento do Enquadramento de Corpos D’água, buscando assim fornecer contribuições a estes municípios que subsidiem às tomadas de decisão quanto à utilização dos recursos, de modo a garantir o cumprimento da legislação ambiental vigente (VON SPERLING, 2014; NOVOTNY, 2003; BRAGA, 2005).

As informações levantadas e analisadas sobre cada uma das ações, bem como sua espacialização sobre território delimitado pela bacia do rio Doce, trarão mais elementos para qualificar a análise dos dados de quantidade/qualidade de água e biodiversidade aquática que estão sendo produzidos no âmbito do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. Essas informações serão utilizadas nos processos de modelagem previstos. Desta forma, o levantamento e a análise contínua de ações relacionadas ao uso e ocupação do solo, ao uso e manejo da água, ao saneamento básico, ao manejo de rejeitos, dentre outras, auxiliarão no aperfeiçoamento dos cenários de modelagem.

3. OBJETIVOS

Os objetivos do Projeto serão apresentados por linhas de ação que o compõem:

- **Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce e sedimento**

no ambiente estuarino-marinho do rio Doce

O objetivo desta linha de ação é subsidiar a interpretação dos resultados toxicológicos e das análises de qualidade de água, identificando a percentagem de vazão oriunda de cada sub-bacia que compõe a bacia do rio Doce e quantificando os sedimentos que tem origem na erosão das encostas e na ressuspensão de material de fundo, além de avaliar cenários de eventos extremos e de ações a serem realizadas no leito do rio Doce.

- **Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce**

Monitorar e analisar o comportamento de descargas líquidas e sólidas no Rio Doce, bem como fluxos e variações de níveis d'água, a fim de subsidiar os pesquisadores das áreas de biologia e modelagem ambiental que integram o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, na caracterização do ambiente estudado.

Avaliar a conectividade hidrológica do sistema flúvio-estuarino do Rio Doce por meio da análise da variabilidade espacial e temporal dos fluxos de água, sedimentos, nutrientes e contaminantes (i.e., elementos traço) para seção estuarina região da foz do rio e sistema marinho adjacente. A avaliação integrada do sistema flúvio-estuarino possibilitará uma melhor compreensão do nível e exposição da biota aquática, dulcícola, estuarina e marinha, em relação aos contaminantes e os potenciais efeitos fisiológicos nas comunidades biológicas e ecológicas nos ecossistemas aquáticos.

- **Caracterização e análise de interrelações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática**

Compreensão das interrelações do conjunto de ações na bacia hidrográfica do Rio Doce desenvolvidas como respostas da Fundação Renova ao rompimento da barragem de Mariana com aspectos de quantidade/ qualidade de água e biodiversidade aquática e fluxos de água, sedimentos e nutrientes, no ambiente flúvio-estuarino-marinho visando proposições de controle e aperfeiçoamento destas ações de forma a maximizar os efeitos positivos e minimizar os efeitos negativos sobre o ambiente flúvio-estuarino-marinho.

Compreensão, em um contexto mais geral, de interrelações e efeitos de alterações de uso e ocupação de solo, incluindo as relacionadas com agricultura, pecuária e mineração.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Nesta seção são apresentadas as submetas relacionadas às linhas de ação do Programa de Monitoramento:

META 1 - Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce e sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce

Submeta 1: *Refinamento dos mapas Pedológico e de Uso do Solo da bacia*

Nos anos anteriores esta meta já foi desenvolvida, porém mapas pedológicos mais detalhados de áreas da bacia oriundos de estudos de terceiros poderão ser disponibilizados. Dessa forma, durante todo o andamento do estudo, serão realizadas buscas de novos mapas pedológicos, os quais serão incorporados ao banco de dados geográficos existente, podendo ser incorporados ao modelo hidrológico de bacia em utilização, visando a melhoria da qualidade dos resultados da modelagem. Do mesmo modo, mudanças relevantes do uso do solo da bacia serão identificadas por meio de busca constante na literatura e imagens disponibilizadas, podendo também serem incorporadas ao modelo hidrológico de bacia em utilização. Por ser ação de caráter contínuo, mantém-se a proposta de atualização dos mapas pedológicos e de uso do solo da bacia visando sempre a melhoria da qualidade dos produtos da modelagem hidrológica.

Submeta 2: *Caracterização do leito do rio Doce e dos reservatórios existentes*

Para a aplicação do módulo de sedimentos para modelagem da geração e do transporte de sedimentos por modelos matemáticos, é de suma importância a caracterização da morfologia do leito do rio e dos reservatórios, além da caracterização dos aspectos construtivos e operacionais das barragens. Desta forma, será feita busca constante dos dados citados, os quais serão incorporados ao banco de dados existente, visando a constante melhoria dos resultados da modelagem hidrológica e de sedimentos.

Submeta 3: *Seleção de modelo de qualidade da água que simule o transporte de sedimentos considerando a ressuspensão de material de fundo*

A modelagem da ressuspensão de material de fundo está no limite do conhecimento atual e o módulo de transporte de sedimentos do modelo SWAT pode não ser o mais eficiente. Desta forma, serão identificados modelos, além do SWAT, que façam essa simulação ou que permitam ser adaptados para o cumprimento desta submeta.

Submeta 4: *Modelagem da erosão e do transporte de sedimentos*

O modelo selecionado para o cumprimento da submeta 3 terá o seu módulo de transporte de sedimentos acionado, visando estimar a quantidade de sedimentos que aporta na zona estuarina do rio Doce. Primeiramente, este modelo será calibrado utilizando dados monitorados de descarga sólida (Submeta 06), em seguida, o modelo será rodado para toda a bacia do rio Doce objetivando simular os sólidos que aportam ao rio Doce via erosão, assim como a ressuspensão de sólidos. Poderão também ser simulados cenários de eventos extremos de vazão e mudanças significativas de uso do solo, assim como a implementação de ações no leito do rio Doce como desassoreamento de reservatórios, obras de dragagem e outras.

META 2 - Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce

Submeta 5: *Quantificação de descargas líquidas e determinação de fluxos e níveis d'água.*

Serão realizadas 6 campanhas por ano, de descargas líquidas e fluxos de água nas seções P21, localizada em Linhares, e P26, localizada próximo à foz do Rio Doce por meio da utilização de ADCP (medições na seção transversal da calha fluvial). Os resultados obtidos serão utilizados para caracterização do ambiente e no estudo de modelagem numérica.

Submeta 6: *Estimativas de descargas sólidas.*

Serão realizadas 6 campanhas hidrossedimentométricas por ano para estimativas de descargas sólidas em 2 seções do Rio Doce, P21, localizada em Linhares, e a antiga P22 será realocada para uma seção a montante da UHE Aimorés, de forma a quantificar as descargas sólidas afluentes ao reservatório da UHE, conforme nova malha amostral. Para tal serão coletadas amostras de sedimentos suspensos integradas na vertical e de sedimentos de fundo. As campanhas serão realizadas, preferencialmente em período úmido, quando ocorre o maior aporte de sedimentos para os cursos d'água. O comportamento espaço-temporal das descargas sólidas estimadas será analisado multidimensional e multicriterialmente em subsídio à caracterização do ambiente e avaliação conjunta de dados biológicos.

Submeta 7: *Será determinada a produção mensal e anual de água (m^3), sedimentos em suspensão (t), nutrientes (kg) e elementos traço (kg) do sistema fluvial para os sistemas estuarino e marinho.*

Ao final de 23 meses será determinada a produção anual, a qual será ponderada para determinação da produção relativa por área drenada (i.e., t/km^2) (MILLIMAN; FARNSWORTH, 2011; TONG et al., 2015). Será considerada a variabilidade espaço-temporal dos fluxos a partir da determinação da vazão e das concentrações de sedimentos, nutrientes e elementos traço nas estações amostrais no curso final do Rio Doce.

Submeta 8: *Serão previstas duas campanhas adicionais de monitoramento hidrossedimentométrico e/ou de descargas líquidas caso seja demandado ao PMBA.*

Caso seja demandado pela contratante serão realizadas campanhas adicionais em situação de eventos específicos, como eventos de cheias.

META 3 - Caracterização e análise de interrelações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática

Submeta 9: *Levantamento, acompanhamento e sistematização das ações.*

Identificação, mapeamento e sistematização de ações desenvolvidas como respostas da Fundação Renova ao rompimento da barragem de Mariana na bacia hidrográfica do Rio Doce com potencial para produzirem variações na quantidade/qualidade de água e na biodiversidade aquática, bem como nos fluxos de água, sedimento e nutrientes. Para isso, serão consultados documentos produzidos no âmbito da Renova, do CIF e de suas Câmaras Técnicas, dos Comitês de Bacia Hidrográfica (CBHs), da AGEVAP, entre outros, sendo realizadas modelagens em ambiente SIG e construção de coleção organizada e estruturada de dados sistematizados destas ações. Também estão previstas consultas

a algumas dessas Câmaras Técnicas e visitas a áreas onde ações estejam ocorrendo. Dentre as Câmaras Técnicas que serão acompanhadas estão CT-Bio, CT-Flor, CT-SHQA e CT-Rejeitos.

Submeta 10: *Levantamento e análise de informações relativas a monitoramentos de quantidade, qualidade de água e biodiversidade aquática realizados nas bacias onde foram ou estejam sendo desenvolvidas as ações.*

Serão buscadas junto à ANA, IGAM, IEMA, AGERH, RENOVA, dentre outras fontes, informações a respeito de resultados monitoramentos relativos a postos situados mais próximos a jusante dos locais das ações. Serão analisados os resultados dos monitoramentos supracitados em conjunto com os obtidos no PMBA.

Na análise de informações se buscará verificar possíveis efeitos das ações de resposta ao rompimento da barragem de Fundão realizadas pela Fundação Renova desenvolvidas na bacia, incluindo restauração florestal, recuperação de APPs e nascente, recuperação do Reservatório Risoleta Neves e esgotamento sanitário. Além dos efeitos destas ações de resposta se buscará analisar aqueles resultantes de outras alterações de uso e ocupação de solo na bacia sobre aspectos relacionados com fluxos de água e sedimentos, incluindo as relacionadas com agricultura, pecuária e mineração.

Submeta 11: *Proposição de controles e melhoria para as ações na bacia*

Em função dos resultados de análise de efeitos das ações sobre os aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade serão propostas medidas de controle e melhoria buscando maximização dos impactos positivos e minimização dos impactos negativos.

Submeta 12: *Modelagem e otimização das contribuições pontuais de esgotos domésticos relacionadas com o Programa 31.*

Simulação da qualidade de água dos corpos receptores dos efluentes domésticos dos municípios que compõem o Programa 31 e identificação das eficiências mínimas de tratamento necessárias ao atendimento do Enquadramento de corpos d'água, como subsídio aos municípios contemplados quanto à alocação e utilização dos recursos oriundos deste Programa.

As metas apresentadas a seguir estão relacionadas às três linhas de ação:

Submeta 13: *Subsídios à interpretação dos resultados das análises de qualidade de água, toxicológicos e de biodiversidade aquática em outros projetos da rede.*

Análise dos fluxos de água e sedimentos e das características das ações sob a ótica das suas influências sobre a qualidade de água, toxicidade e biodiversidade no ambiente flúvio-estuarino-costeiro visando melhor compreensão dos resultados de monitoramentos realizados em outros projetos do PMBA.

Submeta 14: *Cenários de simulação para avaliação de efeitos de modificações de uso e ocupação do solo.*

De acordo com as ações levantadas, bem como os resultados do monitoramento, serão propostos

diferentes cenários para avaliação dos efeitos das modificações de uso e ocupação do território.

5. PRODUTOS

Nesta seção são apresentados os produtos relacionados às linhas de ação do Programa de Monitoramento.

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<i>Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce e sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce</i> • Mapa Pedológico e de Uso do Solo existentes. • Dados dos reservatórios existentes no rio Doce e dos aspectos construtivos e operacionais das usinas. • Dados hidrológicos das estações fluviométricas e pluviométricas em funcionamento na bacia do Rio Doce • Estimativa da percentagem de sedimentos produzidos por erosão de encostas e provenientes da ressuspensão.	Marco Aurélio Caiado
<i>Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce</i> • Vazão Fluvial. • Fluxo d'água, correntes. • Série temporal de níveis d'água. • Concentração e granulometria de sedimentos suspensos. • Gráfico com curva granulométrica e tabela com classificação granulométrica e concentração de sedimentos suspensos. • Concentração e granulometria de sedimentos suspensos e de fundo, associado a descargas líquidas. • Estimativa de descargas sólidas pelo método Modificado de Einstein. • Produção anual de água (m³), sedimentos (t), nutrientes (kg) e metais (kg) do sistema fluvial.	Daniel Rigo
<i>Caracterização e análise de interrelações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática</i> • Modelagem e otimização das contribuições pontuais de efluentes domésticos do P31. • Sistematização dos dados e informações das ações. • Indicação de efeitos das ações de resposta ao rompimento da barragem de Fundão realizadas pela Fundação Renova desenvolvidas na bacia, incluindo restauração florestal, recuperação de APPs e nascente, recuperação do Reservatório Risoleta Neves e esgotamento sanitário	Antônio Sérgio Ferreira Mendonça

Proposição de possíveis controles e aperfeiçoamentos nas ações desenvolvidas como respostas ao rompimento na bacia.	
<i>Produtos comuns a todas as linhas de ação</i> - Relações existentes entre os parâmetros abióticos e os fluxos estimados. - Proposição dos cenários.	Antônio Sérgio Ferreira Mendonça Daniel Rigo Diogo Costa Buarque Marco Aurélio Caiado

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
- Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce e sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce; - Refinamento dos mapas Pedológico e de Uso do Solo da bacia do rio Doce; - Avaliação das vazões oriundas das diversas sub-bacias que compõem a bacia do rio Doce. - Modelagem de erosão e transporte de sedimentos na bacia do rio Doce; - Modelagem da ressuspensão de rejeito presente no leito do rio Doce; - Interação com demais projetos objetivando subsidiar explicações sobre as diferenças na qualidade da água entre as diversas campanhas de monitoramento.	Marco Aurélio Caiado
<i>Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce;</i> - Avaliação da variabilidade sazonal das vazões afluentes à foz do Rio Doce; - Avaliação da variabilidade sazonal, semi-diurna e semanal de fluxos d'água e correntes, para identificação do comportamento hidrodinâmico da região estuarina do Rio Doce; - Avaliação da variação sazonal de níveis d'água do Rio Doce, na porção estuarina; - Avaliação de interrelação entre os dados obtidos; - Avaliação da variabilidade sazonal de descargas sólidas em suspensão afluentes à foz do Rio Doce; - Avaliação da variabilidade sazonal de descargas sólidas de fundo afluentes à foz do Rio Doce; - Estimativa de descargas sólidas totais pelo método Modificado de Einstein. - Análise da variação espaço-temporal dos fluxos hidrológicos na porção final do Rio Doce baseado em amostragens mensais.	Daniel Rigo
Subsídio a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o	Antônio Sérgio Ferreira Mendonça

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho; • Categorização das ações identificadas; • Espacialização das ações sobre o território da bacia (Mapas); • Análise dos indutores e pressões associados a cada uma das ações; • Avaliação dos potenciais impactos de cada ação sobre os fluxos de água, sedimento e nutrientes; • Incorporação das informações levantadas ao modelo hidrossedimentológico; • Avaliação integrada dos potenciais impactos do conjunto de ações/intervenções identificadas sobre os fluxos de água, sedimentos e nutrientes.	
<i>Produtos comuns a todas as linhas de ação</i> • Análise das relações existentes entre os parâmetros abióticos e os fluxos estimados. • Identificação dos parâmetros e sub-bacias para comporem a proposição dos cenários.	Antônio Sérgio Ferreira Mendonça Daniel Rigo Diogo Costa Buarque Marco Aurélio Caiado

6. METODOLOGIA

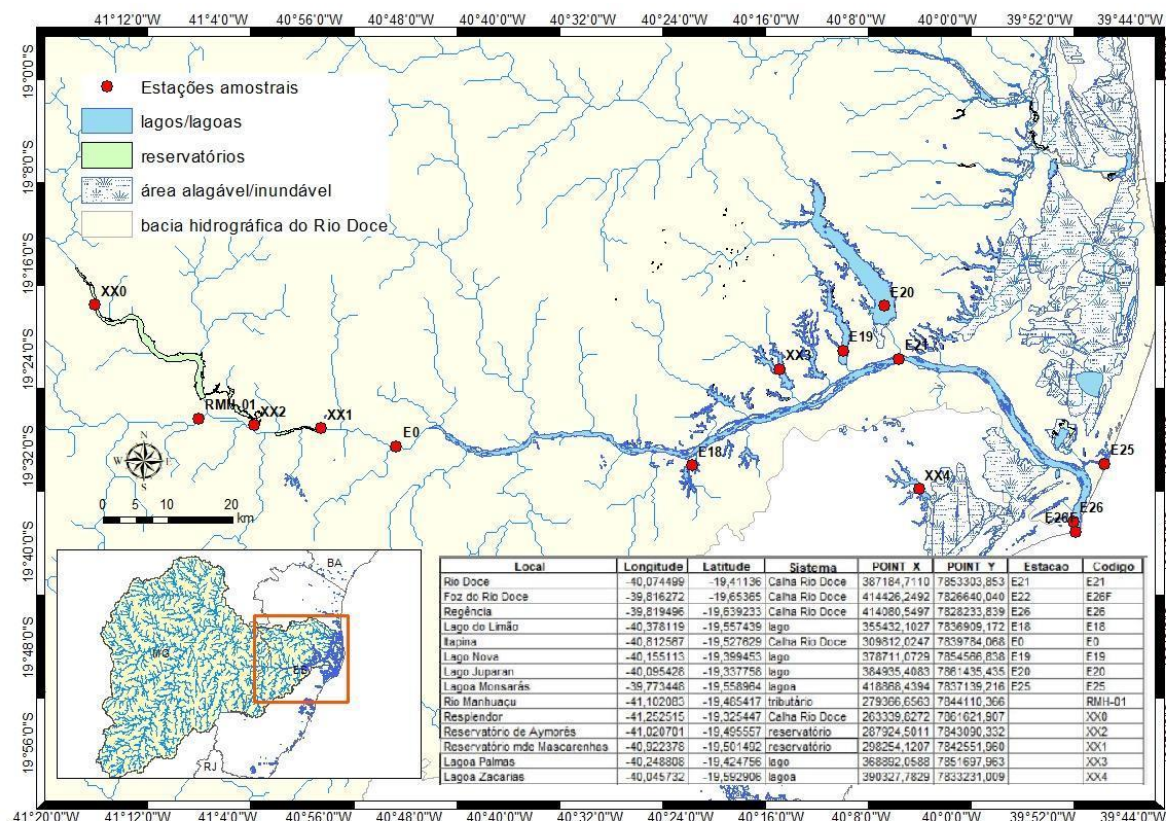
Nesta seção são apresentados aspectos metodológicos relacionados a cada uma das três atividades (linhas de ação) do Projeto Bacia Integração – reflexos de ações na bacia do Rio Doce nos sistemas aquáticos continental e marinho.

6.1. Malha e Frequência Amostral

A seguir na Figura 1 é apresentado o mapa com a distribuição das estações amostrais.

Cabe observar que o P22, utilizado para monitoramento de fluxos de sedimentos será realocado para uma seção a montante do reservatório da UHE Aimorés. Uma vez que os resultados indicam que seria mais proveitoso alterar a localização desse ponto, tendo em vista que a nova malha amostral inclui parte de Minas Gerais. A numeração do novo ponto será definida posteriormente.

Figura 1: Mapa Amostral



6.2. META 1 - Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce e sedimento no ambiente estuarino-marinho do rio Doce.

Serão feitas buscas ativas em órgãos governamentais e em sites de periódicos buscando informações sobre publicações de mapas Pedológicos e de Uso do Solo da bacia do rio Doce. As informações cartográficas obtidas serão arquivadas e os mapas Pedológico e de Uso do Solo da bacia do rio Doce atualizados.

Serão buscados, junto à Renova e aos operadores das hidrelétricas, dados dos reservatórios existentes nas calhas dos rios da bacia do rio Doce que forem considerados relevantes para a modelagem hidrológica e de produção e transporte de sedimentos. Serão também buscadas junto à Renova informações sobre bolsões de sedimentos existentes no leito do rio Doce.

Para cumprimento da submeta 3, será realizado estudo dos modelos de qualidade de água existentes que possuem habilidade de simular o transporte e a ressuspensão de sedimentos nos rios. O modelo SWAT está sendo utilizado pelo grupo para a simulação hidrológica da bacia do rio Doce. O seu módulo de produção e transporte de sedimentos será considerado, assim como os de outros modelos existentes. O modelo que se mostrar mais adequado será utilizado nas etapas posteriores.

Com o refinamento dos dados de solo, uso de solo e da morfologia do rio Doce e dos reservatórios nele existentes, o modelo que se mostrar mais adequado será aplicado à bacia do rio Doce com o seu módulo de erosão habilitado, possibilitando quantificar, de forma contínua, os sedimentos aportados

ao leito do rio advindos da erosão das encostas. Dados monitorados de descarga de sólidos serão utilizados para calibrar o modelo escolhido no que tange à simulação de erosão e transporte de sedimentos.

Em caso de o grupo considerar necessário, poderão ser feitas modificações no código fonte do modelo escolhido visando a simulação da ressuspensão de sólidos presentes no leito dos rios.

Após o ajuste e calibração do modelo, este será utilizado na simulação de cenários de eventos extremos de vazão e mudanças significativas de uso do solo, assim como da implementação de ações no leito do rio Doce como desassoreamento de reservatórios, obras de dragagem e outras.

Para cumprimento da submeta 4, os dados oriundos desta linha de ação serão compartilhados com os demais projetos, subsidiando as discussões sobre a qualidade da água e toxicidade no estuário a partir do conhecimento da origem da água e da quantificação dos sedimentos advindos da erosão de encostas e da ressuspensão de rejeitos presentes no leito do rio.

6.3. META 2 - Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce

As medições de vazão e fluxos d'água serão feitas com ADCP, e os dados processados em software específico para tal finalidade.

Os dados de vazão serão avaliados segundo sua sazonalidade. Os dados de fluxos d'água serão avaliados segundo sua sazonalidade e variação semi-diurna (maré). Níveis d'água serão medidos com sensor de pressão e armazenados em datalogger. Esses dados serão tabelados e comparados com variação de vazões afluentes à região estuarina.

Para estimativas de descargas sólidas serão coletadas amostras de água para análise de sedimentos suspensos, e amostras de sedimentos de fundo.

As medições de descargas sólidas de sedimentos em suspensão serão realizadas pelo método Igual Incremento de Largura, com uso de amostrador de integração na vertical. As amostras coletadas serão enviadas ao LABHIDRO/UFES para análises de concentração e granulometria de sólidos suspensos.

Os dados para elaboração das curvas granulométricas dos sedimentos em suspensão serão obtidos através do Método do Tubo de Retirada pela Base (CARVALHO, 2008). A classificação granulométrica dos sedimentos suspensos será feita segundo a American Geophysical Union. As concentrações de sólidos suspensos e dissolvidos serão determinadas pelo mesmo método de análise, sendo obtidas concentrações de sólidos dissolvidos e sólidos suspensos em planilhas de cálculo.

Serão coletadas amostras de sedimento de fundo, com uso de draga, para determinação das distribuições granulométricas dos materiais dos leitos. As amostras serão acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas para o LABHIDRO.

As curvas granulométricas serão obtidas a partir dos resultados das análises dos sedimentos realizadas pelo Método de Peneiramento. A classificação granulométrica dos sedimentos de fundo

será feita segundo metodologia indicada pela American Geophysical Union (CARVALHO, 2008).

A equação $Q_{ss} = 0,0864 \cdot Q \cdot C_{ss}$ será utilizada nas estimativas de descargas sólidas em suspensão, na qual Q_{ss} é a descarga sólida em suspensão (t/d); Q é a vazão (m^3/s) e C_{ss} é a concentração de sedimentos suspensos (mg/L):

As descargas sólidas totais serão estimadas pelo Método de Einstein modificado por Colby e Hembree (1955). Por este método as descargas totais de sedimentos são obtidas a partir de medições de descargas de sedimentos em suspensão na parte superior da seção de escoamento, entre a superfície e pontos localizados a uma pequena distância do fundo, e de extrapolação das cargas em suspensão medidas para a faixa situada próxima ao fundo (CARVALHO, 2008). Com uso da metodologia descrita, obtêm-se as descargas sólidas em suspensão, por arraste, e total.

Os cálculos serão feitos a partir de parâmetros hidráulicos correspondentes às seções monitoradas, considerando as características do material amostrado em suspensão e no leito. Os dados utilizados serão os seguintes:

- vazão (m^3/s);
- velocidade média de escoamento (m/s);
- área da seção transversal (m^2);
- largura da seção transversal (m);
- profundidade média das verticais de coletas de sedimentos (m);
- concentração de sedimentos em suspensão (ppm ou mg/l);
- distribuição granulométrica de materiais do leito e em suspensão coletados na seção (m);
- temperatura da água ($^{\circ}C$).

Os dados de nutrientes (i.e., nitrogênio, fósforo e silício) e metais serão fornecidos pelo Tema “Caracterização limnológica dos ecossistemas fluviais, lacustres e estuarinos do Baixo Rio Doce”. A frequência amostral para coleta de água será mensal no período chuvoso e bimestral no período seco.

A partir destes dados e dos obtidos nesta linha de ação serão estimados os fluxos mensais e anuais de água (m^3), sedimentos, nutrientes e metais (kg). Os fluxos serão determinados pelo produto Descarga Líquida x Concentração.

6.4. META 3 - Caracterização e análise de interrelações envolvendo ações na bacia hidrográfica e aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade aquática

Serão levantadas as ações já realizadas e em execução na bacia hidrográfica do Rio Doce pela Fundação Renova como respostas ao rompimento da barragem de Mariana. Para tanto, serão

realizadas consultas a documentos produzidos por entidades responsáveis por ações na bacia – Renova, CIF e suas Câmaras Técnicas, Comitês de Bacia Hidrográfica (CBHs), AGEVAP, prefeituras, órgãos gestores de recursos hídricos, entre outras.

No que se refere à sistematização dos dados e informações, será realizada a categorização de ações que estão sendo realizadas na bacia, bem como sua espacialização sobre o território. Neste sentido, as ações levantadas serão diferenciadas e classificadas conforme a temática (Ex: Saneamento, Reflorestamento, Manejo de Rejeitos, dentre outras). Adicionalmente, será utilizado um software de Sistema de Informações Geográficas para o mapeamento georreferenciado das ações e atribuição das informações de suas classes. Visando o acompanhamento das ações realizadas na bacia, será empenhado esforço de articulação com os entes envolvidos para aquisição de dados e informações correspondentes. A pesquisa sistemática em bases públicas e sites visa facilitar o processo de acompanhamento previsto nesta atividade. Neste sentido, caso necessário serão realizadas visitas à Renova, AGEVAP, IEMA, SEAMA e ICMBio/ES. Haverá participação em algumas reuniões, de interesse para este estudo, de Câmaras Técnicas do CIF, dentre elas a CT-Bio, CT-Flor, CT-SHQA e CT-Rejeitos. Esta última em especial porque, sob a perspectiva de que os planos de manejo de rejeitos dos 17 trechos impactados estarão sendo implementados, é importante conhecimento de quais alternativas de manejo de rejeito serão aplicadas e como, onde e quando o serão, visto seu potencial para afetar aspectos de quantidade/qualidade de água e biodiversidade aquática fluxos de água, sedimento e nutrientes. Está prevista participação em reuniões, de interesse para a linha de ação, de Comitês de Bacias Hidrográficas da região hidrográfica do Doce, para conhecimento da implementação de ações previstas no Plano de Bacia do Rio Doce, entre outras.

Todas as informações e dados coletados ou gerados nas atividades anteriores serão armazenados em uma estrutura organizada de dados para subsidiar a análise dos efeitos do conjunto de ações identificadas sobre aspectos de quantidade/ qualidade de água e biodiversidade aquática e fluxos de água, sedimentos e nutrientes. Posteriormente, todas as informações produzidas serão inseridas na estrutura de Dados Geral do Projeto, podendo ser utilizada nos processos de modelagem hidrossedimentológica e de qualidade de água previstos.

Os dados e informações levantados nas etapas anteriores serão processados de forma a fornecer informações sobre os potenciais impactos de ações específicas, identificadas na bacia, sobre aspectos quali-quantitativos da água e fluxos de água, sedimentos e nutrientes no ambiente flúvio-estuarino-costeiro.

Serão escolhidos locais onde estejam sendo desenvolvidas ações objetivando realização de visitas visando maior compreensão das mesmas.

Serão buscadas junto à ANA, IGAM, IEMA, AGERH, RENOVA (inclusive PMQQQS), dentre outras fontes, informações a respeito de resultados monitoramentos relativos a postos situados mais próximos a jusante dos locais das ações. Serão analisados os resultados dos monitoramentos supracitados em conjunto com os obtidos no PMBA.

Na análise de informações se buscará verificar possíveis efeitos das ações desenvolvidas na bacia,

incluindo restauração florestal, recuperação de APPs e nascente, recuperação do Reservatório Risoleta Neves, esgotamento sanitário e manejo de rejeitos. Serão também analisadas informações relativas a alterações de uso e ocupação do solo da bacia relacionadas com atividades de agricultura, pecuária e mineração, dentre outras, relativamente a efeitos sobre fluxos de água e sedimentos e biodiversidade aquáticas.

Em função dos resultados da análise de efeitos das ações sobre os aspectos de quantidade/qualidade da água e biodiversidade serão propostas medidas de controle e aperfeiçoamento buscando maximização dos impactos positivos e minimização dos impactos negativos das mesmas.

Serão desenvolvidas simulações de qualidade de água dos corpos receptores dos efluentes domésticos dos municípios que compõem o Programa 31 e identificação das eficiências mínimas de tratamento necessárias ao atendimento do Enquadramento de corpos d'água, como subsídio aos municípios contemplados quanto à alocação e utilização dos recursos oriundos deste programa (VON SPERLING, 2014; NOVOTNY, 2003).

6.5. Metodologia referente as metas comuns às três linhas de ação:

Especificamente sobre a meta 13 *“Subsídios para a interpretação dos resultados das análises de qualidade de água, toxicológicos e de biodiversidade aquática”*, os produtos relativos às metas 1 a 12 serão apresentados em relatórios, de forma resumida e ilustrada, para comunicação com os demais pesquisadores do PMBA, visando facilitar a consideração dos resultados relativos a fluxos de águas e sedimentos, ações respostas da RENOVA e variações de uso e ocupação do solo na interpretação de resultados dos demais monitoramentos.

No que tange à meta 14 *“Cenários de simulação para avaliação de efeitos de modificações de uso e ocupação do solo”*, a proposição de cenários, assim como da escala espacial, será feita a partir de estudo de análise de sensibilidade, afim de identificação de sub-bacias e parâmetros de maior relevância para comporem os cenários propostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, G. F., MARTINS, F. C. O., LÉLLIS, F. S. & SANTANA, S. E. (2012). Integrated river basin management: incorporating coastal zone issues. BILIBIO, C., HENSEL, O. AND SELBACH, J. F. (eds.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics and case studies in Brazil**. Jaguarão, Universidade Federal do Pampa / University of Kassel / Universidade Federal do Maranhão. 3: 831-872.

BRAGA, B. (2005). **Introdução à engenharia ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall. 318 p.

CARVALHO, N. O. (2008). **Hidrossedimentologia prática**. 2º ed. Rio de Janeiro, Interciência

CROSSLAND, C. J., KREMER, H. H., LINDEBOOM, H. J., MARSHALL, J. I., MARSHALL-CROSSLAND, J. AND TISSIER, M. D. A., Eds. (2005). **Coastal fluxes in the Anthropocene**. The Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone Project of the International Geosphere-Biosphere Programme Berlin, Springer. 231.

LIMA, J.E.F.W. (2006). **Fluxo de sedimentos em suspensão no exutório de grandes bacias hidrográficas em território brasileiro**. In: VII Encontro Nacional de Engenharia de Sedimentos. Anais..., Porto Alegre: nov. 2006.

MILLIMAN, J.D. & FARNSWORTH, K.L. (2011). **River discharge to the coastal ocean: a global synthesis**. Cambridge, Cambridge University Press. 978-1107612181

NOVOTNY, Vladimir. (2003) **Water quality: diffuse pollution and watershed management**. 2. ed. New Jersey: John Wiley. 864 p.

OLIVEIRA, J.C.; AGUIAR, W.; CIRANO, M.; GENZ, F. & AMORIM, F.N. de. (2018). A climatology of the annual cycle of river discharges into Brazilian continental shelves: from seasonal to interannual variability. **Environmental Earth Sciences**, 77:192. doi: 10.117/s12665-018-7349-y.

SOUZA, W.F.L. & KNOPPERS, B. (2003), Fluxos de água e sedimentos a costa leste do Brasil: relações entre a tipologia e as pressões antrópicas. **Geochimica Brasiliensis**, 17(1):57-74.

TONG, Y., ZHAO, Y., ZHEN, G., CHI, J., LIU, X., LU, Y., WANG, X., YAO, R., CHEN, J. & ZHANG, W. (2015). Nutrient loads flowing into coastal waters from the main rivers of China (2006–2012). **Scientific Reports**, 16678.

VON SPERLING, M. (2014). **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, Belo Horizonte, 4. ed. Edition

LIMNOLOGIA ABIÓTICA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Gilberto Fonseca Barroso, Ph.D.	Coordenador	UFES
Carlos Eduardo Stein, M.Sc.	Pesquisador	FEST
Fernando Henrique Lemos, M.Sc.	Pesquisador	FEST
Felicidade Porto Lobiancho	Pesquisador	FEST
Julia de Almeida Leite, M.Sc.	Pesquisador	FEST
Emanuele Correa Santos	Bolsista de Iniciação Científica	FEST
Debora Gonçalves Barbosa	Bolsista de Iniciação Científica	FEST
A contratar	Bolsista Recém Doutor	FEST

2. ESCOPO

Os principais resultados do PMBA para os ecossistemas aquáticos do BRD indicam que a maior vazão fluvial do RD promove o incremento da turbidez fluvial associada a material particulado em suspensão. Nessas condições também são observados incrementos de fósforo total, silicato e nitrogênio particularmente na forma inorgânica dissolvida, nitrato. Este último nutriente possivelmente está associado as aminas utilizadas no processamento de minério de ferro. A maior exportação de materiais pelo RD para o oceano costeiro adjacente ocorre no período de vazão fluvial elevada no período úmido do ano. Durante o período úmido e em particular durante o verão a estratificação térmica nos ecossistemas lacustres, com exceção do Lago Juparanã, promove a anoxia do fundo da coluna d'água com condições redutoras e o incremento de metais dissolvidos no fundo da coluna d'água devido a difusão do sedimento.

Assim, a continuidade do monitoramento visa avaliar a dinâmica dos parâmetros limnológicos em função da variabilidade climática e hidrológica nos ecossistemas fluviais e lacustres considerando a seguinte premissa: pulsos hidrológicos de vazões fluviais altas transportam materiais da região à montante da bacia hidrográfica do RD, sobretudo de rejeito de minério de ferro ainda retido no reservatório Risoleta Neves e áreas marginais dos rios Gualaxo do Norte e Carmo.

3. OBJETIVOS

Avaliar a dinâmica temporal e variabilidade espacial dos parâmetros limnológicos, com relação direta

ou indireta aos rejeitos de minério de ferro, de ecossistemas fluviais e lacustres em relação a variabilidade climática e hidrológica.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

O desenvolvimento das metas será baseado em amostragens e registros de dados em campo, análises hidroquímicas de amostras de água e sedimento em laboratório e análises estatísticas dos dados para avaliação da variabilidade temporal (e.g., períodos seco e úmido) e espacial (e.g., diferentes tipos de ecossistemas e variabilidade na calha do RD).

META 1 - Desenvolver a base de dados limnológicos da água e sedimento do ecossistema fluvial da calha do Rio Doce

Inclusão dos resultados de 14 campanhas amostrais no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024, considerando cinco estações amostrais na calha do Rio Doce, sendo duas estações novas (Resplendor em MG para avaliação do fluxo de materiais à montante dos reservatórios de Aimorés e Mascarenhas e a estação em área de remanso e sob condições estuarinas da foz do RD), de forma a tornar a análise espaço-temporal mais robusta.

META 2 - Desenvolver a base de dados limnológicos da água e sedimento da área de remanso e sob condições estuarinas da foz do Rio Doce

Subsídio a compreensão da dinâmica de sedimentação e/ou dissociação de elementos químicos, sobretudo metais, carregados na fração particulada em suspensão. A base de dados será organizada com a inclusão dos resultados de 14 campanhas amostrais no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024.

META 3 - Desenvolver a base de dados de fluxos de materiais (nutrientes inorgânicos dissolvidos e metais dissolvidos)

Estimados para estação E21 da calha do RD com a inclusão dos resultados de 14 campanhas amostrais no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024, de forma a tornar a análise temporal mais robusta.

META 4 - Desenvolver a base de dados limnológicos da água e sedimento do ecossistema fluvial da calha do Rio Manhuaçu (MG), tributário do Rio Doce

Inclusão dos resultados de 14 campanhas amostrais no período de agostos de 2022 a janeiro de 2024, considerando uma estação amostral, visando o Rio Manhuaçu, como referência para dinâmica dos parâmetros limnológicos do RD.

META 5 - Desenvolver a base de dados limnológicos da água e sedimento dos ecossistemas lacustres do Baixo Rio Doce

Inclusão dos resultados de 14 campanhas amostrais no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024, considerando seis estações amostrais em ecossistemas lacustres naturais (e.g., três lagos e três lagoas) e artificiais (dois reservatórios), sendo quatro estações novas (reservatórios de Aimorés e Mascarenhas, Lago Palmas e Lagoa Cacimbas), de forma a tornar a análise espaço-temporal mais robusta com a inclusão de ecossistemas lacustres de referência para retenção de poluentes e contaminantes (reservatórios), ecossistema lacustre profundo e sem influências do rejeito de minério (Lago Palmas) e lagoa costeira rasa (Lagoa Cacimbas) com possível intrusão de rejeito de minério.

META 6 – Desenvolver a base de dados das concentrações totais de C, N e suas razões isotópicas no sedimento

Análise das razões de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da MOP do sedimento, para monitorar a variação espacial e temporal e as origens da MO nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce. A base de dados será organizada com a inclusão dos resultados de 14 campanhas amostrais no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
<u>Coluna d'água:</u> Temperatura (°C) Transparência (Profundidade do disco de Secchi em m): ecossistemas lacustres Turbidez (UNT) Oxigênio dissolvido (mg/L) Potencial Redox (mV) pH Alcalinidade total (mg CaCO_3/L) Sólidos totais dissolvidos – STD (mg/L) Material Particulado em Suspensão – MPS (mg/L) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) Salinidade (‰) Concentração de nutrientes totais e inorgânicos dissolvidos (nitrogênio, fósforo e silício) ($\mu\text{g}/\text{L}$) Concentração de nutrientes totais (nitrogênio e fósforo) ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Gilberto F Barroso

Concentração de clorofila <i>a</i> (µg/L) Concentração de matéria orgânica dissolvida (mg/L) Fluxos fluvial (Rio Doce) de nutrientes inorgânicos dissolvidos e metais dissolvidos (kg ou t/dia) Sedimento: Granulometria (% areia e lama) Concentração de matéria orgânica (%) pH Condutividade elétrica (µS/cm) Fosfato na água intersticial (µg/L) Fósforo sequencial (P-amorfo, P-cristalino, P-hidroxiapatita, P-detrital, P-orgânico e P-total) (µg/g): apenas para as estações ainda não monitoradas (RD-Resplendor, Rio Manhuaçu, Reservatório Aimorés, Reservatório Mascarenhas, Lago Palmas, Lagoa Cacimbas e RD-foz) Isótopos estáveis de carbono e nitrogênio δ¹³C e δ¹⁵N	

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 23º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- Análise da variação espaço-temporal do ambiente físico-químico com ênfase nas concentrações do material dissolvido e particulado na coluna d'água dos ecossistemas aquáticos dulcícolas do Baixo Rio Doce (amostragem mensal no período úmido e bimestral no período seco); - Análise espaço-temporal da variação do sedimento, quanto a granulometria e composição, depositado na calha fluvial e no fundo dos lagos, lagoas e laguna; - Análise do sinergismo de fatores ambientais, como a condição de oxiredução no fundo da coluna d'água dos ecossistemas lacustres (i.e., lagos e reservatórios) sob condições de estratificação térmica, quanto a exposição da biota aquática aos metais traço; - Avaliação da retenção de nitrogênio, fósforo e silício nos sedimentos dos reservatórios da calha fluvial do RD à montante do BRD em decorrência da fragmentação fluvial; - Análise temporal dos fluxos de nutrientes inorgânicos dissolvidos (N, P e Si) e metais-traço dissolvidos para o sistema marinho adjacente, considerando a integração dos dados da coluna dados de vazão fluvial na estação fluvial E21; - Análise da variabilidade nas razões isotópicas à luz das modificações físicas sofridas no sistema (alteração na intensidade luminosa causada por aumento na turbidez, aporte de material externo, etc.).	Gilberto F Barroso

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

A campanha amostral será desenvolvida no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024 com frequência amostral mensal no período úmido do ano (outubro a março) e bimestral no período seco (abril a setembro).

A malha amostral é formada por quatorze estações, sendo seis fluviais (cinco na calha do Rio Doce) e oito lacustres (três em lagos, duas em lagoas, uma em laguna e duas em reservatórios) (Figura 2 e Tabela 1). As estações fluviais na calha do Rio Doce são Resplendor (MG), representando o fluxo fluvial antes do represamento pelos reservatórios das UHEs de Aimorés e Mascarenhas, seguindo por Itapina (Colatina, ES), Linhares, Regência e área de remanso na foz do Rio Doce. Como rio tributário foi selecionado o Rio Manhuaçu que desagua à montante da UHE de Mascarenhas. Os lagos ($Z_{\text{méd}} > 3,0$ m) são Palmas, Nova e Juparanã, enquanto as lagoas ($Z_{\text{méd}} < 3,0$ m) são Areal e Cacimbas e a laguna é representada por Monsarás. Os reservatórios são representados pelas represas de Aimorés e Mascarenhas.

Figura 2: Malha amostral do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.

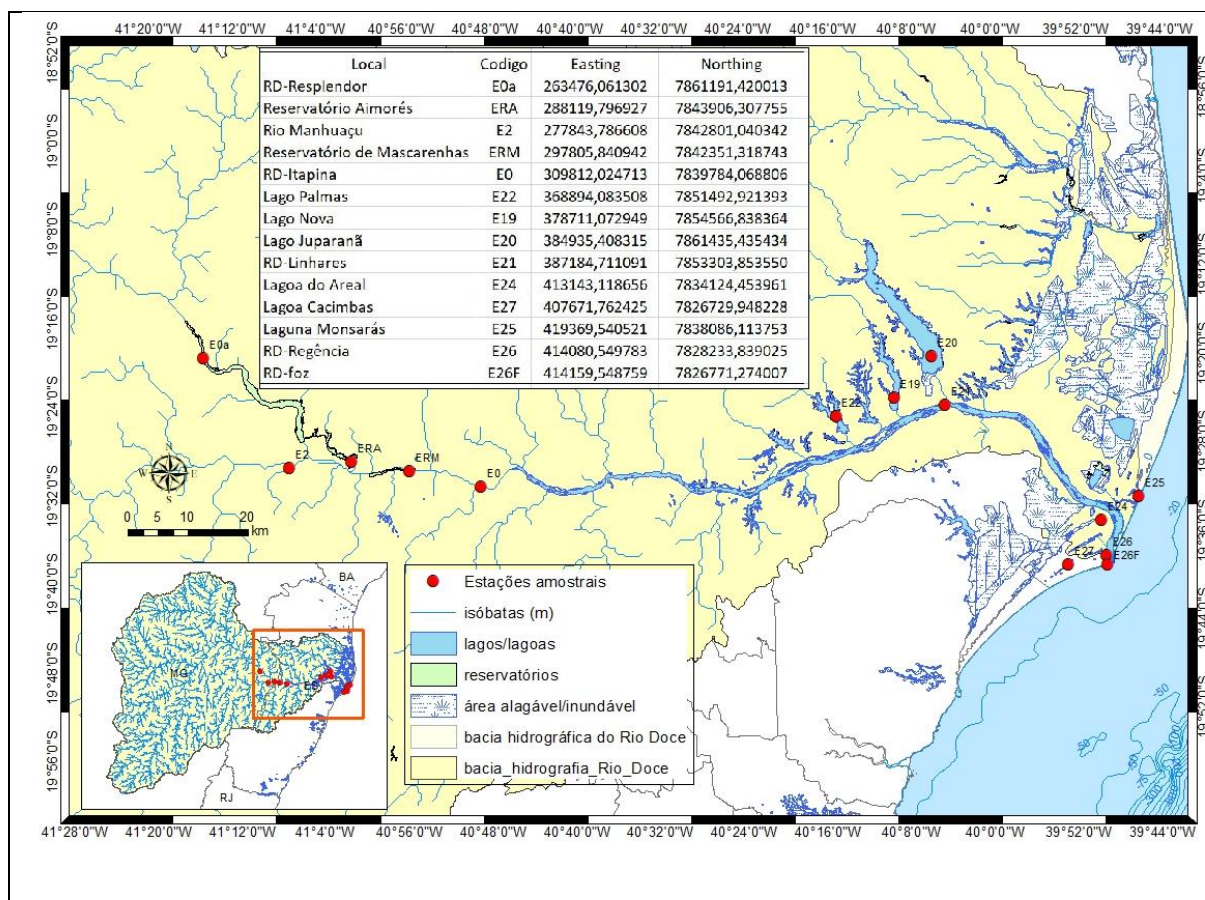


Tabela 1: Coordenadas UTM (datum SIRGAS 2000) das estações amostrais do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.

Estações amostrais		Coordenadas UTM	
Local	Código	Easting	Northing
RD-Resplendor	E0a	263476,061302	7861191,420013
Reservatório Aimorés	ERA	288119,796927	7843906,307755
Rio Manhuaçu	E2	277843,786608	7842801,040342
Reservatório de Mascarenhas	ERM	297805,840942	7842351,318743
RD-Itapina	E0	309812,024713	7839784,068806
Lago Palmas	E22	368894,083508	7851492,921393
Lago Nova	E19	378711,072949	7854566,838364
Lago Juparanã	E20	384935,408315	7861435,435434
RD-Linhares	E21	387184,711091	7853303,853550
Lagoa do Areal	E24	413143,118656	7834124,453961
Lagoa Cacimbas	E27	407671,762425	7826729,948228
Laguna Monsarás	E25	419369,540521	7838086,113753
RD-Regência	E26	414080,549783	7828233,839025
RD-foz	E26F	414159,548759	7826771,274007

RD: Rio Doce.

Nas estações amostrais fluviais a amostragem será feita no meio da calha do rio. Para coleta de água subsuperficial será utilizada garrafa de Niskin (2,8L) com montagem horizontal e para coleta de sedimento de fundo será utilizada draga de van Veen.

Nas estações lacustres do tipo lagos será feita coleta de água com garrafa de Niskin (2,8L) com montagem vertical nas profundidades de subsuperfície, 1% de luz (i.e., radiação fotossintética ativa) e 1,0 m próximo ao fundo. Nas lagoas e na laguna a coleta de água será feita no meio da coluna d'água. Nos reservatórios a amostragem será feita conforme os lagos.

As amostras de água serão acondicionadas em frascos de polipropileno (1 L), previamente descontaminados. Os frascos com as amostras de água para determinação das concentrações de material particulado em suspensão - MPS, alcalinidade, clorofila *a*, nutrientes, matéria orgânica dissolvida (MOD) serão armazenados refrigerados e ao abrigo da luz. As amostras para metais totais e dissolvidos serão acondicionadas em frascos de polipropileno (1L) sendo acidificadas com ácido nítrico (HNO₃) P.A. (concentração final de 1%, sendo 1,000 µL de HNO₃ para cada 1L (ou 500 mL) de amostra.). As amostras para determinação da fração dissolvida de metais serão mantidas resfriadas até a filtração (membranas de acetato/éster de celulose 47 mm e 0,45 µm) e posteriormente congeladas até o momento das análises no Tema Geoquímica (Laboratório de Ensaio de Combustíveis – LEC da UFMG).

Amostras de água para determinação da composição mineralógica serão coletadas em frascos de polipropileno (1L) para posterior filtração em membranas de acetato/éster de celulose 47 mm e 0,45

µm. As membranas serão encaminhadas para análise pelo Tema Mineralogia (Laboratório de Gênese e Mineralogia de Solos – LAGEM da UFES).

Em todas as estações amostrais lacustres as coletas de sedimento de fundo serão feitas com amostrador do tipo Ekman, sendo que devido ao sedimento arenoso da estação E25 (Laguna de Monsarás) será utilizado o coletor do tipo van Veen. Para evitar a contaminação da amostra para determinação de metais-traço serão coletadas alíquotas de sedimento úmido na parte central e superficial da amostra com colheres de plástico e acondicionadas em frascos de polipropileno (250 mL) com tampa, previamente descontaminados. As amostras de sedimento para granulometria, matéria orgânica, extração sequencial de fósforo serão acondicionadas em uma segundo pote plástico de polipropileno (250 mL) previamente descontaminado.

Nos lagos, lagoas e na laguna serão feitas amostragens complementares de água e sedimentos na região litorânea onde serão coletadas as amostras hidrobiológicas para macrófitas aquáticas, perifíton e zooplâncton.

6.2. METAS 1,2 e 4 - Coluna d'água

A perfilagem de temperatura (°C), condutividade elétrica (µS/cm) e salinidade (‰) da coluna d'água será feita nas estações fluviais e lacustres (lagos, reservatórios, lagoas e laguna) da superfície ao fundo com CTD SonTek CastAway. Dados de turbidez (UNT), pH, Potencial Redox (mV), oxigênio dissolvido (mg/L) serão registrados por meio de sonda multiparâmetros YSI Exo 2, previamente calibrada com soluções de referência para pH, condutividade elétrica e turbidez nas profundidades de subsuperfície, 1% da radiação fotossintética ativa (RFA) e próximo ao fundo nos lagos. A determinação da profundidade de 1% da RFA nos lagos será determinada pelo produto da profundidade do disco de Secchi com o coeficiente 3, conforme Cole (1994). O registro de dados físico-químicos nos ecossistemas lacustres será feito a cada metro de profundidade.

A coleta de amostras de água para análises hidroquímicas será feita com garrafa de Niskin (2,8 L) com montagem vertical nos ecossistemas lacustres e horizontal nos rios. A turbidez nas profundidades discretas será determinada *in situ* com turbidímetro LaMotte 2020, previamente calibrado, e os resultados expressos em UNT. As análises hidroquímicas serão realizadas em laboratório conforme APHA (2005).

O MPS é determinado por gravimetria em membranas de acetato/éster de celulose (47 mm e 0,45 µm), previamente pesados em balança analítica (0,1 mg), e os resultados expressos em mg/L. A clorofila a (µg/L) será determinada por fluorimetria com extração em acetona 90% e acidificação para conversão de feopigmentos (APHA, 2017).

A matéria orgânica dissolvida (MOD) será determinada após filtração (filtros de fibra vidro de 47 mm e porosidade de 0,77 µm) por oxidação com combustão catalítica em TOC Shimadzu TOC-L com as concentrações expressas em µg/L (APHA, 2017).

Para determinação das concentrações de nitrogênio e fósforo total, alíquotas de água não filtradas serão digeridas simultaneamente com persulfato de potássio. O nitrato será reduzido a nitrito coluna de Cd e a leitura em espectrofotômetro. O fosfato será determinado pelo método do ácido ascórbico e o silicato pelo método silicomolibdico e ambos serão lidos em espectrofotômetro. Os íons nitrito, nitrato, amônio e fosfato serão analisados, em amostras não digeridas e filtradas em membrana 0,45 μm , por espectrofotometria em fluxo contínuo (APHA, 2017) no sistema Seal Analyser Autoanalyser AA3. Alternativamente os nutrientes inorgânicos dissolvidos poderão ser analisados por cromatografia de íons (APHA, 2017) no sistema Dionex IC1100. Os resultados dos nutrientes serão representados em $\mu\text{g/L}$.

A alcalinidade das amostras de água será determinada por titulação com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,02N até o valor de pH = 4,35 e os resultados expressos em mg CaCO_3/L (APHA, 2017).

6.3. METAS 1,2 e 4 - Sedimento

A medição do pH e condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$) da camada superficial do sedimento será determinada *in situ* com a sonda Hanna HI98191. A granulometria será determinada via úmida por difração à laser no sistema Malvern e os resultados reportados em mm conforme a escala de Wentworth em areia ($> 63\mu\text{m}$), silte (2,0 e 63,0 μm) e argila ($< 2,0 \mu\text{m}$) (Håkanson & Jansson, 1983), sendo os resultados de silte argila agregados como lama. Os resultados são expressos em %. O conteúdo de matéria orgânica será determinado por meio de ignição em forno mufla a 400°C por 4 horas e os resultados expressos em %.

A extração de fósforo sequencial será determinada por espectrofotometria de P-amorfo, P-cristalino, P-hidroxiapatita, P-detrital, P-orgânico e P-total, reportados em $\mu\text{g/g}$ (Anschutz & Deborde, 2016). P na água intersticial, será determinado por espectrofotometria com reação com ácido ascórbico e resultado expresso em $\mu\text{g/L}$ (APHA, 2017).

6.4. METAS 1,2, 3 e 4 - Fluxos de materiais

Os fluxos de material particulado em suspensão, nutrientes inorgânicos dissolvidos e metais dissolvidos serão determinados pelo produto da concentração do analito pela vazão fluvial no momento da amostragem hidroquímica na estação amostral (Quilbé et al., 2006) da calha do Rio Doce (E21). Os resultados serão representados em kg/dia ou t/dia.

6.5. META 6 - Concentrações totais de C, N e suas razões isotópicas

A sub amostragem do sedimento coletado será feita com espátula de metal raspando os centímetros superficiais ($\sim 2\text{cm}$). A amostra deverá ter em torno de 5g e deverá ser armazenada em recipientes de alumínio calcinados e congelada até o processamento no laboratório.

Isótopos estáveis: Na avaliação do aporte orgânico para os sedimentos da região costeira, a amostra

é descarbonatada com o uso de HCl 10%, lavada com água ultrapura e centrifugada para a remoção do sobrenadante. O residual é seco por liofilização e a análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio (sem a remoção do carbono inorgânico) será 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 é referenciada contra o material padrão seguindo a fórmula a seguir:

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

Sendo, R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

A caracterização da matéria orgânica será realizada através de análises sobre a composição de seus elementos majoritários, a predominância isotópica entre eles e as moléculas que formam. As análises da composição elementar (C e N) nos sedimentos deste estudo são realizadas após a descarbonatação, através da adição de HCl 1,0 mol L⁻¹ diretamente nas amostras dentro dos frascos de análises. Este procedimento é então 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) são realizadas com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando um analisador elementar. Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico são realizados com padrão certificado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anschutz, P. & Deborde, J. Spectrophotometric determination of phosphate in matrices from sequential leaching of sediments. *Limnology and Oceanography Methods*, 14(4): 245-256. 2016
- APHA. *Standard method for the examination of water and wastewater*. 23rd ed., Washington, D.C., American Public Health Association. 2017
- Cole, G.A. *Textbook of limnology*. Waveland Press Inc., 1994
- Håkanson, L. & Jansson, M. *Principles of lake sedimentology*. Cladwell, The Blackburn Press. 1983
- Quilbé, R., Rousseau, A.N., Duchemin, M., Poulin, A., Gangbazo, G. & Villeneuve, J.P. Selecting a calculation method to estimate sediment and nutrient loads in streams: application to the Beaurivage River (Quebec, Canada). *Journal of Hydrology*, 326(1-4): 295-310. 2006

MINERALOGIA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Danilo de Lima Camêlo	Pesquisador / Coordenador	UFES
Luiz Aníbal da Silva Filho	Bolsista de Pós-doutorado	UFES
Luan Mauri Cyrino	Bolsista de Iniciação Científica	UFES
Gabriel da Silva Abreu Souza	Bolsista de Iniciação Científica	UFES
David Lukas de Arruda Silva	Bolsista DCTI	UFES

2. ESCOPO

O Tema Mineralogia tem evidenciado uma complexa composição mineralógica nos sedimentos e água dos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce, com consideráveis variações qualitativas e quantitativas. Os sedimentos são constituídos por caulinita, mica, quartzo, gibbsita, anatásio, rutilo, goethita, hematita e, eventualmente, K-feldspato, enquanto que a água, com uma composição mais simples, tem apresentado partículas suspensas de caulinita, mica, quartzo, gibbsita, goethita e hematita. O monitoramento e a avaliação da mineralogia dos ecossistemas fluviais, lacustres e estuarinos do Baixo Rio Doce buscam fornecer subsídios para melhor compreender a dinâmica físico-química e biogeoquímica destes ecossistemas aquáticos através de uma perspectiva espaço-temporal.

3. OBJETIVO

Caracterizar e estimar os constituintes minerais dos ecossistemas fluviais, lacustres e estuarinos do Baixo Rio Doce visando dar continuidade à avaliação evolutiva das consequências do aporte de rejeito de mineração, oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG) nos ecossistemas aquáticos e na biodiversidade associada.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Avaliação e monitoramento da qualidade de água e sedimentos da área dulcícola referente ao Estado do Espírito Santo. O monitoramento consiste no acompanhamento das características mineralógicas por meio de amostragem em campo com coleta de amostras, análises laboratoriais, e análise e discussão de dados de ecossistemas aquáticos (fluviais, lacustres e estuarinos) em periodicidade

amostral mensal no período úmido e bimestral no período seco.

META 1 - Identificação e estimativa quantitativa da composição mineralógica dos sedimentos e materiais particulados em suspensão (água) a fim de avaliar os efeitos dos impactos do rejeito de mineração e classificar os diferentes ambientes da área dulcícola quanto ao potencial e riscos de contaminação por metais.

META 2 - Determinação do índice de cristalinidade (Fe_o/Fe_d) e concentração de Fe e Mn associados aos oxihidróxidos de Fe dos sedimentos buscando compreender a dinâmica de sorção e liberação de elementos essenciais e, ou, potencialmente tóxicos em ecossistemas aquáticos dulcícolas.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
1. Sedimentos: - Teores dos constituintes minerais - Suscetibilidade magnética - Concentração de Fe e Mn associados aos oxihidróxidos de Fe - Índice de cristalinidade dos oxihidróxidos de Fe (Fe_o/Fe_d)	Danilo de Lima Camêlo
2. Materiais particulados em suspensão (água): - Teores dos constituintes minerais	Danilo de Lima Camêlo

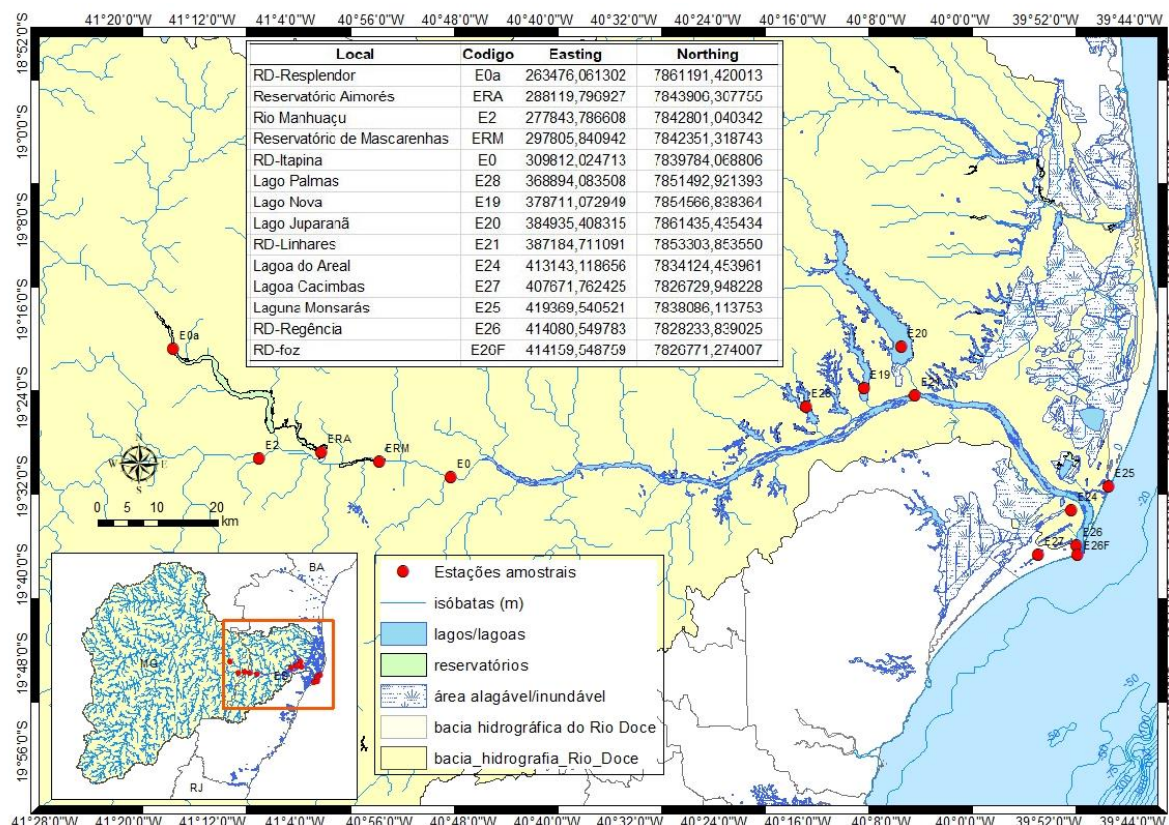
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- Análise da variação espaço-temporal dos teores dos constituintes minerais, suscetibilidade magnética, concentração (Fe e Mn) e cristalinidade (Fe_o/Fe_d) dos oxihidróxidos de Fe nos sedimentos depositados na calha fluvial e no fundo dos lagos do Baixo Rio Doce; - Análise da variação espaço-temporal dos teores dos constituintes minerais nos materiais particulados em suspensão na coluna d'água dos ecossistemas aquáticos dulcícolas do Baixo Rio Doce.	Danilo de Lima Camêlo

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

A malha amostral é formada por quatorze estações, sendo seis fluviais (cinco na calha do Rio Doce) e oito lacustres (três em lagos, duas em lagoas, uma em laguna e duas em reservatórios) (Figura 3). A frequência amostral será mensal entre outubro e março e bimestral entre maio e setembro. A primeira campanha amostral ocorrerá em agosto de 2022 tendo duração de dois anos.

Figura 3: Malha amostral e coordenadas UTM (datum SIRGAS 2000) do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.



As estações fluviais na calha do Rio Doce são Resplendor (MG), representando o fluxo fluvial antes do represamento pelos reservatórios das UHEs de Aimorés e Mascarenhas, seguindo por Itapina (Colatina, ES), Linhares, Regência e área de remanso na foz do Rio Doce. Como rio tributário foi selecionado o Rio Manhuaçu que desagua à montante da UHE de Mascarenhas.

Os lagos ($Z_{méd} > 3,0$ m) são Palmas, Nova e Juparanã, enquanto as lagoas ($Z_{méd} < 3,0$ m) são Areal e Cacimbas e a laguna é representada por Monsarás. Os reservatórios são representados pelas represas de Aimorés e Monsarás.

As coletas de água (materiais particulados em suspensão – MPS) e sedimentos para análises mineralógicas no Laboratório de Gênese e Mineralogia de Solos – LAGEM da UFES serão realizadas pelo Tema Limnologia conforme descrito abaixo.

Nas estações amostrais fluviais, a amostragem será feita no meio da calha do rio. Para coleta de água subsuperficial será utilizada garrafa de Niskin (2,8 L) com montagem horizontal, e para coleta de sedimento de fundo será utilizada draga de van Veen.

Nas estações lacustres do tipo lagos ($Z_{\text{méd}} > 3,0$ m) será feita coleta de água com garrafa de Niskin (2,8 L) com montagem vertical nas profundidades de subsuperfície, 1 % de luz (i.e., radiação fotossintética ativa) e 1,0 m próximo ao fundo. Nas lagoas e na laguna ($Z_{\text{méd}} < 3,0$ m), a coleta de água será feita no meio da coluna d'água. Nos reservatórios a amostragem será feita conforme os lagos.

Amostras de água para difratometria de raios X serão coletadas em frascos de polipropileno (1 L) previamente descontaminados para posterior filtração de partículas em membranas de acetato/éster de celulose 47 mm e 0,45 μm .

Em todas as estações amostrais, as coletas de sedimento de fundo serão feitas com amostrador do tipo Ekman. Para evitar a contaminação da amostra para determinação de metais-traço serão coletadas alíquotas de sedimento úmido na parte central e superficial da amostra com colheres de plástico e acondicionadas em frascos de polipropileno com tampa, previamente descontaminados. As amostras de sedimento para difratometria de raios X, suscetibilidade magnética e extrações seletivas de oxihidróxidos de Fe serão acondicionadas em sacos plásticos do tipo zip bag previamente descontaminados.

6.2. META 1 – Difratometria de raios X (DRX)

As amostras de sedimentos e materiais particulados em suspensão (MPS) serão analisadas por difração de raios X em aparelho RIGAKU MINIFLEX 600 com radiação $\text{CuK}\alpha$ e operado a 40 kV e 15 mA. Os padrões de difração serão gerados em modo contínuo a uma velocidade de $1,2^\circ 2\theta \text{ min}^{-1}$, passo de $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$ e varredura de 4 a $70^\circ 2\theta$. As amostras serão montadas em lâminas escavadas (não orientadas) após trituração em almofariz de ágata para redução do tamanho de partículas ($< 10 \mu\text{m}$) seguindo as recomendações de Bish & Reynolds Junior (1989) para análises quantitativas de fases minerais.

A composição mineralógica será identificada nos padrões de DRX a partir do reconhecimento da posição e intensidade relativa dos picos de difração dos planos atômicos dos minerais. Para isso, o software MATCH! (versão 3.10) e fichas CPDS (Putz & Brandenburg, 2015; Mincrust, 2022) serão utilizadas. A análise semiquantitativa dos minerais será realizada pelo método da relação de intensidade de referência-RIR (I/I_c) (Visser & Wolff, 1964), usando o software MATCH! (versão 3.10) (Putz & Brandenburg, 2015). A avaliação da qualidade final do processo de quantificação (ajuste do refinamento) será baseada no índice de Bragg (R_p) (Young, 1995).

6.3. META 1 – Suscetibilidade magnética

A suscetibilidade magnética volumétrica (κ , adimensional) pode fornecer informações semiquantitativas dos oxihidróxidos de Fe ferrimagnéticos (magnetita e maghemita) (Camêlo et al., 2017, 2018). Portanto, será usado um sistema Bartington MS3 (Bartington Instruments LTD, Oxford, England) acoplado a um sensor MS2B, operado em baixa (κ_{lf}) (0,47 kHz) e alta (κ_{hf}) (4,70 kHz) frequências. Alíquotas de 10 cm³ de amostras de sedimento, previamente trituradas e passadas em peneira de 0,25 mm (60 mesh), serão obtidas para as medições (Camêlo et al., 2018). A suscetibilidade magnética por unidade de massa (χ_{lf}) será calculada, a partir da suscetibilidade magnética volumétrica, pela equação $\chi_{lf} = (10 \times \kappa_{lf}) / m$, em que m é a massa da amostra, e a suscetibilidade magnética dependente da frequência (χ_{fd} , %), pela equação $\chi_{fd} = 100 \times [(\chi_{lf} - \chi_{hf}) / \chi_{lf}]$ (Dearing, 1999).

6.4. META 2 – Extrações seletivas de oxihidróxidos de Fe

Nos sedimentos serão conduzidas três extrações sucessivas com ditionito-citrato-bicarbonato de sódio (DCB) a 60 °C, para remoção das formas cristalinas (hematita, goethita e maghemita) e pobremente cristalinas (ferridrita e lepidocrocita) de oxihidróxidos de Fe (Mehra & Jackson, 1960), e uma única extração com 0,2 mol L⁻¹ de oxalato ácido de amônio (OAA) a pH 3,0, para remoção apenas das formas pobremente cristalinas (ferridrita e lepidocrocita) (McKeague & Day, 1966). Usando espectroscopia de absorção atômica, os teores de Fe_d e Mn_d extraídos por DCB, e de Fe_o e Mn_o extraídos por OAA, serão determinados.

O índice de cristalinidade dos oxihidróxidos de Fe será obtido a partir da relação Fe_o/Fe_d (Cornell & Schwertmann, 2003; Camêlo et al., 2017).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISH, D.L.; REYNOLDS JUNIOR, R.C. **Sample preparation for x-ray diffraction**. In: BISH, D. L.; POST, J. E. (Ed.). *Modern powder diffraction*. 2nd ed. Washington, DC: Mineralogical Society of America, 73-97. 1989.
- CAMÊLO, D.L.; KER, J.C.; FONTES, M.P.F.; CORRÊA, M.M.; COSTA, A.C.S.; MELO, V.F. **Pedogenic iron oxides in iron-rich Oxisols developed from mafic rocks**. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 41, e0160379. 2017.
- CAMÊLO, D.L.; KER, J.C.; FONTES, M.P.F.; COSTA, A.C.S.; CORRÊA, M.M.; LEOPOLD, M. **Mineralogy, magnetic susceptibility and geochemistry of Fe-rich Oxisols developed from several parent materials**. *Scientia Agricola* 75, 410-419. 2018.
- CORNELL, R.M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VHC Verlag GmbH and Co. KGaA. 2003.
- DEARING, J. **Environmental Magnetic Susceptibility: Using the Bartington MS2 System**. 2nd ed. Chi Publishing, Oakham, UK. 1999.

MCKEAGUE, J.A.; DAY, J.H. **Dithionite and oxalate-extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils.** Canadian Journal of Soil Science 46, 13-22, 1966.

MEHRA, J.P.; JACKSON, M.L. **Iron oxides removal from soils and clays by a dithionite-citrate-bicarbonate system buffered with bicarbonate sodium.** Clays and Clay Minerals 7, 317-27, 1960.

MINCRYST. **Crystallographic and Crystallochemical Database for Minerals and their Structural Analogues.** Disponível em: <<http://database.iem.ac.ru/mincryst/>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

PUTZ, H.; BRANDENBURG, K. **Match!-phase identification from powder diffraction.** Crystal Impact Software, 2015.

VISSER, J.W.; WOLFF, P.M. **Absolute intensities.** Report 641.109. Technisch Physische Dienst, Delft, Netherlands, 1964.

YOUNG, R.A. **The Rietveld Method.** I. U. C. Oxford University Press Inc., New York, 298 p. 1995.

GEOQUÍMICA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Vânia Márcia Duarte Pasa	Pesquisadora	UFMG
Paulo Jorge Sanches Batista	Pesquisador	UFMG
Danniel Mendes	Químico- celestista	UFMG
Poliana Costa	Químico- celestista	UFMG
Pos doc	bolsista	UFMG

2. ESCOPO

A equipe de Geoquímica do PMBA, vem ao longo dos últimos anos monitorando a região dulcícola do Rio Doce situada no Espírito Santo, o que envolve as calhas do Rio Doce e do Rio Guandu, bem como alguns lagos e lagoas, objetivando avaliar o possível impacto nestes ambientes após derramamento do rejeito de Fundão. Os resultados mostram uma evolução temporal com tendência de redução do teor da maioria dos metais monitorados ao longo dos anos, devido à mobilidade dos contaminantes em direção ao ambiente marinho. O monitoramento envolveu também a quantificação de muitos compostos orgânicos como aminas, pesticidas, compostos fenólicos, hidrocarbonetos, compostos poliaromáticos e PCBs - bifenilas policloradas.

Os resultados obtidos mensalmente mostraram que há grande dependência dos teores desses contaminantes inorgânicos e orgânicos, tanto na água (total, dissolvido ou MPS- Material particulado em Suspensão) como no sedimento, com o volume de chuva. Portanto, uma análise dos parâmetros segregando as estações por períodos de seca e chuva, é de grande relevância e indica que provavelmente há material do rejeito de Fundão depositado ao longo das margens dos rios monitorados, que tem sido despejado no Rio Doce e depois no mar, quando as chuvas se intensificam. Efeitos de diluição dos contaminantes, revolvimento e ressuspensão de sedimentos também são esperados para o período de chuvas volumosas. Os resultados mostram que há um acúmulo de contaminantes na foz do Rio Doce, o que mostra que este ponto foi mais impactado que os outros.

No que tange aos compostos orgânicos, constataram-se valores acima dos limites da legislação em alguns pontos, em especial para os compostos fenólicos, PCBs e pesticidas. Dados pretéritos, quando disponíveis, foram usados para estudo comparativo, incluindo também o PMQQS. Todos os poluentes orgânicos foram escolhidos por sua toxicidade e pelo grande potencial de serem gerados pelas atividades antropogênicas ao longo da Bacia do Rio Doce, podendo impactar os seres vivos das regiões estudadas ou atuarem como potencializadores do impacto, através de uma ação sinérgica sobre a biota.

Estudo publicado no **Atlas Geoquímico da Bacia do Rio Doce (CPRM, 2016)** mostra a seguinte **composição média para o rejeito** coletado no *Rio Gualaxo do Norte* pós rompimento de Fundão: Fe ≥ 150.000 ppm, Al 2500 ppm, Mn 314,3 ppm, Ca 180 ppm, P 161 ppm, V 20,17 ppm, Cu 13,87 ppm, Cr 13,50 ppm, Co 1,97 ppm, Ba 12,50 ppm, Zn 12,17 ppm, As 4,83 ppm, Pb 4,1 ppm, Hg 0,05 ppm e Ni 3,10 ppm, além de outros elementos em menor concentração.

Como as regiões atingidas também possuem uma riqueza mineral grande no seu solo, cujos elementos inorgânicos podem lixiviar ou serem arrastados, afetando a composição das águas monitoradas, tem sido feita uma comparação entre os dados pretéritos encontrados para o Rio Doce – **região do Espírito Santo**, antes da chegada da pluma e pós desastre, produzidos pelo órgão ambiental IEMA e dados pós desastre e anteriores ao PMBA (IEMA e PMQQS). Para os lagos e lagoas não se dispõe de dados pretéritos antes do rompimento, como alternativa estão sendo usados dados do PMQQS para comparação

Nesta nova fase do trabalho serão também continuados os estudos de monitoramento de compostos orgânicos em sedimentos, destacando-se aqueles em que há uma legislação, com um limite máximo, para fins de comparação como as bifenilas policlorados (PCBs), fenóis, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e pesticidas. As regiões, os pontos de coleta e a frequência amostral são os mesmos considerados para os contaminantes inorgânicos. A escolha dos contaminantes foi feita de modo a atender o que estava preconizado para o ambiente marinho de modo a complementar uma análise mais global, o que tem sido bastante interessante.

3. OBJETIVO

O presente projeto tem como principal objetivo monitorar os contaminantes químicos da água e dos sedimentos (calha fluvial, reservatórios e alguns lagos e lagoas da bacia do Rio Doce - ES). Para avaliar os contaminantes inorgânicos serão quantificados os teores de metal total e metal dissolvido de Fe, Mn, Al, Cr, Co, Cu, Ba, Zn, AS, Pb, Ni e terras raras em água e os mesmos contaminantes nos sedimentos, para o parâmetro metais totais. Também serão quantificados contaminantes orgânicos nos pesticidas, PCBs (bifenilas policloradas), Fenóis Totais e HPAs (hidrocarbonetos poliaromáticos) nos sedimentos, onde os valores têm se mostrados mais elevados, indicando potencial risco para a biota aquática e a vida humana.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 - Monitoramento de Contaminantes Inorgânicos em Água na Bacia do Rio Doce- Ambiente Dulcícola (ES).

Coleta de amostras de água e análise dos metais, potenciais constituintes do rejeito despejado na bacia

(reservatórios, calha fluvial, lagos e lagoas), quantificando-se metais totais e metais dissolvidos em água, a saber Fe, Al, Mn, Co, Ni, Cu, Cr, Ba, Zn, As, Pb, Ni e terras raras.

META 2 - Monitoramento de Contaminantes Inorgânicos em Sedimentos na Bacia do Rio Doce- Ambiente Dulcícola (ES).

Coleta de amostras de sedimentos e análise dos contaminantes inorgânicos potenciais constituintes do rejeito despejado na bacia (reservatórios, calha fluvial, lagos e lagoas), quantificando-se metais totais a saber Fe, Al, Mn, Co, Ni, Cu, Cr, Ba, Zn, As, Pb, Ni e terras raras.

META 3 - Monitoramento de Contaminantes Orgânicos em Sedimentos na Bacia do Rio Doce- Ambiente Dulcícola (ES)

Coleta de amostras de sedimentos e análise dos contaminantes orgânicos a saber: pesticidas, fenóis totais, PCBs (bifenilas policloradas) e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) presentes na bacia (reservatórios, calha fluvial, lagos e lagoas).

META 4 - Avaliação do Impacto dos contaminantes Químicos Orgânicos e Inorgânicos aquáticos do Baixo Rio Doce (ES)

Avaliação dos parâmetros analisados de forma comparativa com os dados pretéritos disponíveis para a mesma região antes e pós rompimento da barragem de Fundão, levantados pelo IEMA, PMQQS e pelo próprio PMBA, bem como comparar com os limites determinados na legislação nacional e por organismos internacionais (limites CONAMA, NOAA, PEEL e outros).

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- Teor de elementos inorgânicos (Fe, Al, Mn, Zn, Co, Ni, Cu, Cr, Ba, As, Pb e terras raras) em água- Metais Totais; - Teor de elementos inorgânicos (Fe, Al, Mn, Zn, Co, Ni, Cu, Cr, Ba, As, Pb e terras raras) em água- Metais Dissolvidos; - Teor de elementos inorgânicos (Fe, Al, Mn, Zn, Co, Ni, Cu, Cr, Ba, As, Pb e terras raras) em sedimentos- Metais Totais; - Teor de pesticidas em sedimentos - Teor de PCBs em sedimentos - Teor de HPAs em sedimentos	Vânia Márcia Duarte Pasa Jorge Barbeira

-	Teor de Fenóis Totais em sedimentos	

5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
- Análise espaço-temporal dos teores de contaminantes orgânicos e inorgânicos em água e sedimentos - Avaliação da índice de não conformidade considerando o CONAMA e legislação internacional para os contaminantes inorgânicos - Avaliação da índice de não conformidade para os contaminantes orgânicos, considerando o CONAMA e a legislação internacional. - Estudo comparativo dos teores de contaminantes orgânicos e inorgânicos com os dados pretéritos disponíveis. - Análise integrativa de dados bióticos e abióticos para a elaboração de modelos descritivos e preditivos que auxiliem na identificação de impactos crônicos da presença de rejeito.	Vânia Pasa Paulo Barbeira

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

A campanha amostral será desenvolvida no período de agosto de 2022 a janeiro de 2024 com frequência amostral mensal no período úmido do ano (outubro a março) e bimestral no período seco (abril a setembro).

A malha amostral é formada por quatorze estações, sendo seis fluviais (cinco na calha do Rio Doce) e oito lacustres (três em lagos, duas em lagoas, uma em laguna e duas em reservatórios) (Figura 4 e Tabela 2). As estações fluviais na calha do Rio Doce são Resplendor (MG), representando o fluxo fluvial antes do represamento pelos reservatórios das UHEs de Aimorés e Mascarenhas, seguindo por Itapina (Colatina, ES), Linhares, Regência e área de remanso na foz do Rio Doce. Como rio tributário foi selecionado o Rio Manhuaçu que desagua à montante da UHE de Mascarenhas. Os lagos ($Z_{\text{méd}} > 3,0$ m) são Palmas, Nova e Juparanã, enquanto as lagoas ($Z_{\text{méd}} < 3,0$ m) são Areal e Cacimbas e a laguna é representada por Monsarás. Os reservatórios são representados pelas represas de Aimorés e Mascarenhas.

Figura 4: Malha amostral do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.

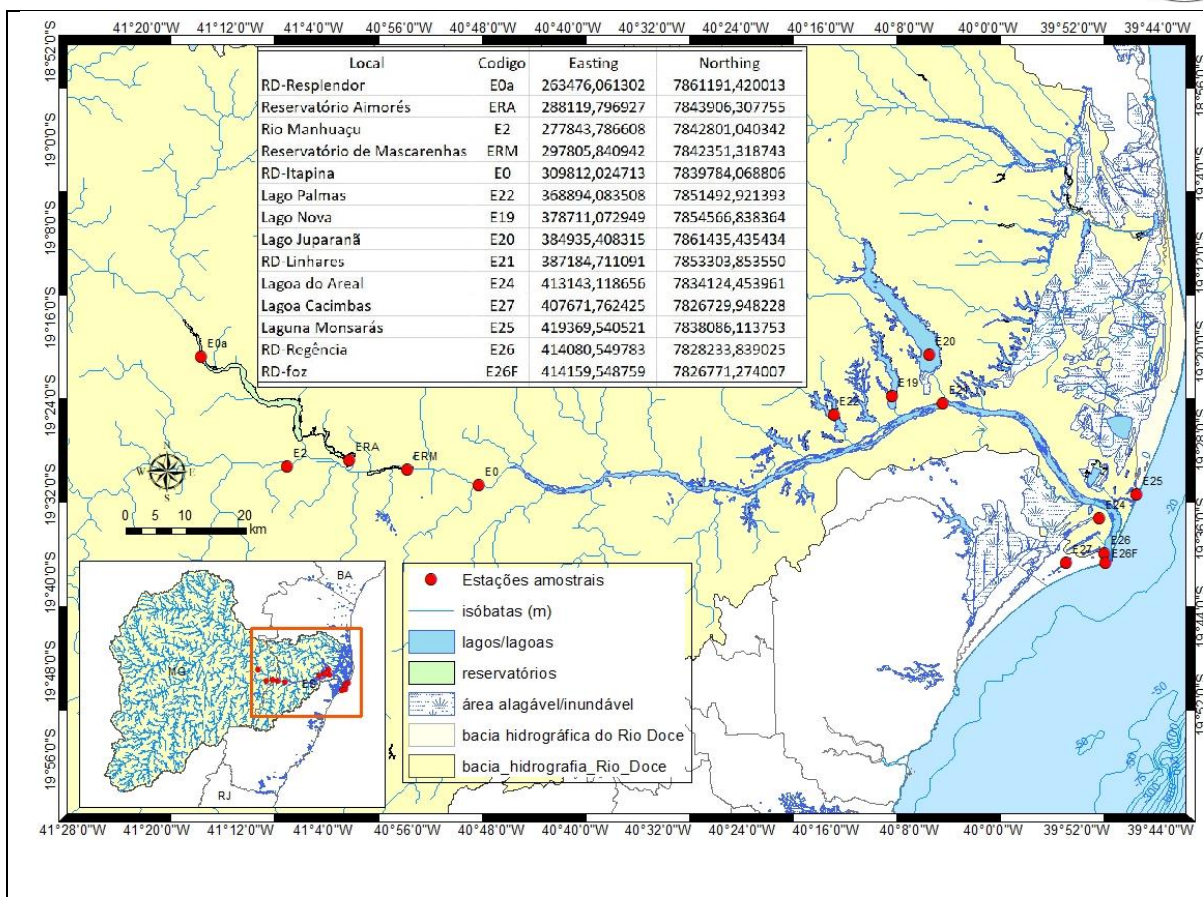


Tabela 2: Coordenadas UTM (datum SIRGAS 2000) das estações amostrais do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.

Estações amostrais		Coordenadas UTM	
Local	Código	Easting	Northing
RD-Resplendor	E0a	263476,061302	7861191,420013
Reservatório Aimorés	ERA	288119,796927	7843906,307755
Rio Manhuaçu	E2	277843,786608	7842801,040342
Reservatório de Mascarenhas	ERM	297805,840942	7842351,318743
RD-Itapina	E0	309812,024713	7839784,068806
Lago Palmas	E22	368894,083508	7851492,921393
Lago Nova	E19	378711,072949	7854566,838364
Lago Juparanã	E20	384935,408315	7861435,435434
RD-Linhares	E21	387184,711091	7853303,853550
Lagoa do Areal	E24	413143,118656	7834124,453961
Lagoa Cacimbas	E27	407671,762425	7826729,948228
Laguna Monsarás	E25	419369,540521	7838086,113753
RD-Regência	E26	414080,549783	7828233,839025
RD-foz	E26F	414159,548759	7826771,274007

RD: Rio Doce.

Nas estações amostrais fluviais a amostragem será feita no meio da calha do rio. Para coleta de água subsuperficial será utilizada garrafa de Niskin (2,8L) com montagem horizontal e para coleta de sedimento de fundo será utilizada draga de van Veen.

Nas estações lacustres do tipo lagos será feita coleta de água com garrafa de Niskin (2,8L) com montagem vertical nas profundidades de subsuperfície, 1% de luz (i.e., radiação fotossintética ativa) e 1,0 m próximo ao fundo. Nas lagoas e na laguna a coleta de água será feita no meio da coluna d'água. Nos reservatórios a amostragem será feita conforme os lagos.

As amostras de água serão acondicionadas em frascos de polipropileno (1 L), previamente descontaminados. Os frascos com as amostras de água para determinação das concentrações de material particulado em suspensão – MPS serão armazenados refrigerados e ao abrigo da luz. As amostras para determinação da fração dissolvida de metais serão mantidas resfriadas até a filtração (membranas de acetato/éster de celulose 47 mm e 0,45 μm) e posteriormente congeladas até o momento das análises no Laboratório de Ensaio de Combustíveis – LEC da UFMG.

Em todas as estações amostrais lacustres as coletas de sedimento de fundo serão feitas com amostrador do tipo Ekman, sendo que devido ao sedimento arenoso da estação E25 (Laguna de Monsarás) será utilizado o coletor do tipo van Veen. Para evitar a contaminação da amostra para determinação de metais-traço serão coletadas alíquotas de sedimento úmido na parte central e superficial da amostra com colheres de plástico e acondicionadas em frascos de polipropileno (250 mL) com tampa, previamente descontaminados. As amostras de sedimento para granulometria, matéria orgânica, extração sequencial de fósforo serão acondicionadas em uma segundo pote plástico de polipropileno (250 mL) previamente descontaminado.

6.2. META 1 - Metais em água

Serão feitas as análises de metais totais, metais dissolvidos e metais totais no material particulado em suspensão (MPS). Serão excluídos: Isótopos no MPS e Análise elementar no MPS. Motivo: as análises foram retiradas por não estarem contribuindo para os estudos, não apresentando correlações, além de serem extremamente trabalhosas e de custo elevado.

6.2.1. Metais traço

As amostras de água coletadas nas estações serão analisadas, pela técnica de Espectrometria Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado com detecção por Espectrometria de Massas (ICP-MS), sob três aspectos: Metais Totais; Metais Dissolvidos; Metais no Material Particulado em Suspensão (MPS). Para todas as amostras serão determinadas as concentrações, em $\mu\text{g L}^{-1}$, de 30 elementos: Al, As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Hg, Ho, La, Lu, Mn, Nd, Ni, Pb, Pr, Sm, Sn, Th, Tm, U, V, Yb e Zn. Para tal será usado o equipamento ICP-MS da marca Agilent – Modelo 8800-QQQ. As curvas analíticas serão construídas usando-se materiais de referência rastreáveis e solventes de elevada pureza.

6.2.2. Metais totais

A fração de metais totais será obtida pela digestão em micro-ondas da amostra adicionada de uma mistura de ácidos (HNO_3 e HCl) segundo norma EPA3515A.

6.2.3. Metais particulados

A fração de metais em MPS será obtida pela digestão da membrana utilizada na filtração da amostra para a análise de metais dissolvidos, em micro-ondas, da amostra adicionada de uma mistura de ácidos (HNO_3 , HCl , HF e H_2O_2), seguida de uma neutralização do HF com solução saturada de ácido bórico. Este procedimento seguirá a norma EPA3052.

6.2.4. Metais dissolvidos

A fração de metais dissolvidos será obtida no filtrado em membrana de 0,45 μm da amostra coletada. A análise será feita de forma direta.

6.3. META 2 - Metais em sedimento

Serão feitas as análises de metais totais e terras raras e serão excluídos: extração sequencial de metais (especiação), metais biodisponíveis e especiação do fósforo em sedimento. Motivo: as análises foram retiradas por não estarem contribuindo para os estudos, não apresentando correlações, além de serem extremamente trabalhosas e de custo elevado.

As amostras de sedimentos coletadas nas estações serão analisadas pela técnica de Espectrometria Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado com detecção por Espectrometria de Massas (ICP-MS), considerando Metais Totais. Para todas as amostras serão determinadas as concentrações, em ppm ou mg kg^{-1} de 30 elementos: Al, As, Ba, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Hg, Ho, La, Lu, Mn, Nd, Ni, Pb, Pr, Sm, Sn, Th, Tm, U, V, Yb e Zn. Para tal será usado o equipamento ICP-MS da marca Agilent – Modelo 8800-QQQ. As curvas analíticas serão construídas usando-se materiais de referência rastreáveis e solventes de elevada pureza. A fração de metais totais será obtida pela digestão em forno micro-ondas da amostra adicionada de uma mistura de ácidos (HNO_3 , HCl , HF e H_2O_2), seguida de uma neutralização do HF com solução saturada de ácido bórico, conforme metodologia EPA 3052.

6.4. META 3 - Compostos orgânicos em sedimentos

Será feita a coleta e análise mensal/bimestral de contaminantes orgânicos nos sedimentos (pesticidas, PCBs, fenóis totais e HPA). Serão excluídos aminas, esteróis, hidrocarbonetos totais em sedimentos. Também serão excluídas todas as análises de orgânicos em água. Motivo: foram excluídas as análises que estavam apresentando valores muito baixos, a maioria com valores inferiores aos limites de quantificação; além de não terem correlação com o rompimento da barragem de Fundão.

6.4.1. Bifenilas policlorados – PCBs

As amostras de sedimentos coletadas nas estações, previamente liofilizadas, serão submetidas a um processo de extração Soxhlet, a um cleanup conforme recomendado pela (UNEP, 1992) e analisadas

pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detector de captura de elétrons (GC-ECD), conforme sugerido pela USEPA 8082A.

A metodologia para análise de PCBs baseia-se em um processo de extração Soxhlet com diclorometano e n-hexano (8 h/amostra), em que são utilizados 10 g da amostra liofilizada de sedimento, acrescido de 2 g de cobre, seguida de uma rotaevaporação (30 minutos/amostra) e secagem do extrato em nitrogênio (5 minutos/amostra). O resíduo é solubilizado em n-hexano, passa por uma coluna de vidro com alumina, eluindo-se com mistura de n-hexano e diclorometano, seguida de rotoevaporação (30 minutos/amostra), secagem em nitrogênio (5 minutos/amostra) e solubilização com n-hexano para a análise cromatográfica. O processo de extração dura em média 2 dias e a análise cromatográfica dos 7 analitos, um padrão interno e dois surrogates, tem um tempo de eluição de duas horas por amostra. O tratamento de dados requer a conferência manual da integração de cada um dos picos.

A análise quantitativa é feita segundo o método da curva analítica, utilizando-se a razão entre as áreas do analito e do padrão interno apropriado, em função da concentração do analito, e as concentrações são reportadas em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

6.4.2. Pesticidas

As amostras de sedimentos coletadas nas estações, previamente liofilizadas, serão submetidas a um processo de extração Soxhlet, a um *cleanup* conforme recomendado pela UNEP, 1992 e analisadas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detector de captura de elétrons (GC-ECD), conforme sugerido pela norma USEPA 8081B.

A metodologia para análise de pesticidas baseia-se em um processo de extração Soxhlet com diclorometano e n-hexano (8 h/amostra), em que são utilizados 10 g da amostra liofilizada de sedimento, acrescido de 2 g de cobre, seguida de uma rotaevaporação (30 minutos/amostra) e secagem do extrato em nitrogênio (5 minutos/amostra). O resíduo é solubilizado em n-hexano, passado por uma coluna de vidro com alumina, eluindo-se com mistura de n-hexano e diclorometano, seguida de rotoevaporação (30 minutos/amostra) e solubilização com n-hexano para a análise cromatográfica. O processo de extração dura em média 2 dias e a análise cromatográfica dos 11 analitos, um padrão interno e dois surrogates, tem um tempo de eluição de duas horas por amostra. O tratamento de dados requer a conferência manual da integração de cada um dos picos.

A análise quantitativa é feita segundo o método da curva analítica, utilizando-se a razão entre as áreas do analito e do padrão interno apropriado, em função da concentração do analito, e as concentrações serão reportadas em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

6.4.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs

As amostras de sedimentos coletadas nas estações, previamente liofilizadas, serão submetidas a um processo de extração Soxhlet conforme recomendado pela USEPA 3540c, a um *cleanup* segundo a USEPA 3630C e analisadas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), conforme sugerido pelo protocolo USEPA 8270D.

A metodologia para análise de HPA baseia-se em um processo de extração Soxhlet com diclorometano (8 h/amostra), são utilizados 10 g da amostra liofilizada de sedimento, acrescido de 2 g de cobre, seguida de uma rotaevaporação (30 minutos/amostra) e secagem do extrato em nitrogênio (5 minutos/amostra). O resíduo será solubilizado em n-hexano, passando por uma coluna de vidro com sílica e alumina, eluindo-se com mistura de n-hexano e diclorometano (segunda fração coletada), seguida de rotoevaporação (30 minutos / amostra) e solubilização com n-hexano para a análise cromatográfica. O processo de extração dura em média 2 dias e a análise cromatográfica dos 16 analitos, os seis padrões internos e um surrogate, tem um tempo de eluição de uma hora por amostra, onde as áreas de cada pico são quantificadas manualmente.

A análise quantitativa é feita segundo o método da curva analítica utilizando-se a razão entre as áreas do analito e do padrão interno apropriado, em função da concentração do analito, e os resultados são reportados em $\mu\text{g kg}^{-1}$

6.4.4. Fenóis

As amostras de sedimentos coletadas nas estações serão submetidas a um processo de tratamento térmico Head Space para injeção no cromatógrafo, conforme recomendado pela USEPA 5021A, e serão analisadas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), conforme sugerido pelo protocolo USEPA 8041A.

A análise quantitativa será feita segundo o método da curva analítica utilizando-se a razão entre as áreas do analito e do padrão interno apropriado, em função da concentração do analito, e as concentrações serão reportadas em mg kg^{-1} .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atlas Geoquímico da Bacia do Rio Doce: Minas Gerais e Espírito Santo. VIGLIO, Eduardo Paim; CUNHA, Fernanda Gonçalves da. CPRM. 238 pag. 2016.

Hatje, V., Pedreira, R. M. A., Rezende, C. E., Schettini, C. A. F., Souza, G. C., Marin, F. C. and Hackspacher, P. C. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific Reports* 7: 10706. 2017.

Licínio, M. V. V. J., Leão, R. T., Gaudereto, F. G., Costa-Gonçalves, A., Patchneelan, S. R., Vidal, M. S. M., Carneiro, M. T. W. D., Freitas, A. C., Evangelista, H. S., Ribeiro, J. N., Pereira, M. G. and Ribeiro, A. V. F. N. Historical trends in sedimentation rates and trace elements accumulation in 'Doce' river, Espírito Santo state, Brazil. *Cadernos de Geociências* 12(1-2): 13-24. 2015.

Magris, R. A., Marta-Almeida, M. M., Monteiro, J. A. F. and Banb, N. C. A modelling approach to assess the impact of land mining on marine biodiversity: Assessment in coastal catchments experiencing catastrophic events (SW Brazil). *Science of The Total Environment*, 659: 828-840. 2019.

Silva, D. C., Bellato, C. R., Neto, J. O. M. and Fontes, M. P. F. Trace elements in river waters and sediments before and after a mining dam breach (Bento Rodrigues, Brazil). *Química Nova* 41(8): 13-24. 2018.

Lopes, L. M. N. The rupture of the Mariana dam and its social-environmental impacts. Pontífica Universidade Católica de Minas Gerais, *Revista Sinapse Múltipla*, 5(1):1-14. 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE & (ICMBIO) Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Termo de Referência 4. Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. 2017.

MACRÓFITAS AQUÁTICAS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Valquíria Dutra	Coordenadora	Universidade Federal do Espírito Santo
Brenno Gardiman Sossai	Mestre II/ Profissional Pleno II	Universidade Federal do Espírito Santo
Francisco Alvaro Almeida Nepomuceno	Mestre II/ Profissional Pleno II	Universidade Federal do Espírito Santo
Lucas de Almeida Silva (a contratar)	Mestre/ Profissional Pleno I	Universidade Federal do Espírito Santo
A contratar	Iniciação Científica - Graduação	Universidade Federal do Espírito Santo

2. ESCOPO

Macrófitas aquáticas são organismos visíveis a olho nu e que apresentam partes fotossinteticamente ativas, permanente a temporariamente submersas ou flutuantes (Cook et al. 1974). Elas apresentam uma ampla diversidade de características, tais quais ciclo de vida relativamente curto e estruturas anatômicas constituídas, basicamente, por aerênquima bem desenvolvido (Junior 2003). Suas formas biológicas são classificadas de acordo com a distribuição no corpo d'água como submersas (fixas ou livres), flutuantes (fixas ou livres), emergentes, anfíbias ou epífitas (Irgang et al. 1984).

No período de outubro de 2018 a maio de 2022, o estudo das macrófitas do Baixo Rio Doce inventariou 107 táxons espécies, pertencentes a 65 gêneros e 33 famílias. Assim como o observado para o fitoplâncton e o perífíton, o número de táxons aumentou ao longo do tempo, e a curva de rarefação indica que os ambientes ainda não atingiram a suficiência amostral. O acréscimo de espécies ocorreu em todas as estações amostrais e entre as espécies inventariadas, *Eichornia crassipes*, *E. azurea*, *Salvinia auriculata* e *S. biloba* são as que necessitam de maior atenção, pois podem se transformar em invasoras altamente competitivas, sendo *E. crassipes* e *S. auriculata* espécies exóticas para a bacia do Rio Doce (Ferreira et al. 2016).

A abundância destas espécies infestantes citadas tem sido afetada negativamente com o aumento da concentração de metais como Ba, Fe, V e Zn, Cu e Mn. Diversos autores reportaram os efeitos deletérios de altas concentrações de metais na água para macrófitas (p.ex. Ingole & Bhole 2003; Lizieri et al. 2011), porém a maioria dos estudos realizados sobre este assunto, foram conduzidos em ambientes controlados.

Os dados coletados nos últimos anos mostram a necessidade da continuação do monitoramento das populações, para que seja possível apontar prováveis alterações na riqueza, abundância, dominância e composição de espécies de macrófitas aquáticas, e também a necessidade da avaliação da absorção dos metais pesados disponíveis e a produção de biomassa.

3. OBJETIVOS

Caracterizar a comunidade de macrófitas aquáticas ao longo do curso do Rio Doce no estado do Espírito Santo.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Caracterização da comunidade de macrófitas aquáticas

Submeta 1.1: Composição e distribuição espacial

Realizar expedições de coleta nas estações amostrais predeterminadas no Âmbito do PMBA, mensalmente no período sazonal chuvoso e de forma bimestral no período seco, para monitorar a composição de macrófitas aquáticas na comunidade e determinar os respectivos aspectos ecológicos. O monitoramento permite visualizar as mudanças das comunidades em resposta às possíveis modificações abióticas decorrentes da recuperação das características originais da bacia do rio Doce. Além disso, análises de composição e distribuição espacial são utilizadas para determinação de possíveis áreas de proteção baseadas nas informações de distribuição geográfica ou especificidade ambiental.

Submeta 1.2: Estrutura da comunidade

Comparar os padrões quali-quantitativo da comunidade (riqueza, abundância, composição, quantificação da biomassa), entre as áreas diretamente afetadas e indiretamente afetadas, espacial e temporalmente. Investigar se há relação entre os atributos bióticos encontrados e os parâmetros físico-químicos abióticos. Analisar os principais índices de diversidade e aspectos ecológicos das comunidades de macrófitas aquáticas, e compará-los entre áreas diretamente e indiretamente afetadas, possibilitará indagações sobre as respostas biológicas dos organismos que sofreram o impacto em questão. Estas análises e comparações são inéditas, já que nenhuma comunidade de macrófitas aquáticas no Brasil chegou a ser impactada de forma demasiada em seu ambiente natural quanto esta em análise. Caso seja necessário, serão sugeridos espécies ou métodos de manejo e controle das populações de macrófitas.

META 2 – Determinação de metais pesados nas macrófitas aquáticas

Avaliar a concentração de metais pesados em espécies bioindicadoras de macrófitas aquáticas,

analisando níveis de contaminação entre os ambientes analisados dentro do PMBA e as respectivas áreas diretamente afetadas e indiretamente afetadas pela pluma de rejeitos. Sabemos que algumas espécies possuem a capacidade de acumular os metais presentes na água, desta forma, a inserção desta análise ajudará a compreender o comportamento biológico dos organismos vegetais analisados, sobretudo em relação à abundância, dominância e biomassa. Este tipo de análise permite avaliar a eficiência dos tecidos vegetais (raiz e folhas) na bioacumulação de metais pesados, sendo um instrumento eficaz de pesquisa e avaliação ambiental.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Lista de espécimes coletados e espécies inventariadas; - Informações sobre os espécimes (planilha com dados de local, data, informações ecológicas e morfológicas de cada espécime coletado); - Parâmetros de riqueza, abundância e biomassa, temporal e espacial; - Concentração de metais pesados nos tecidos vegetais (raízes e folhas).	Valquíria Ferreira Dutra

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Identificação das espécies coletadas nas estações amostrais; - Avaliação da riqueza, composição, abundância e biomassa das macrófitas; - Determinação da interação biótico-abiótico entre as comunidades de macrófitas aquáticas das estações amostrais e os parâmetros físico-químicos analisados no âmbito do PMBA; - Determinação de metais pesados nos tecidos de raízes e folhas, acompanhado pelas análises estatísticas pertinentes.	Valquíria Ferreira Dutra

6. METODOLOGIA

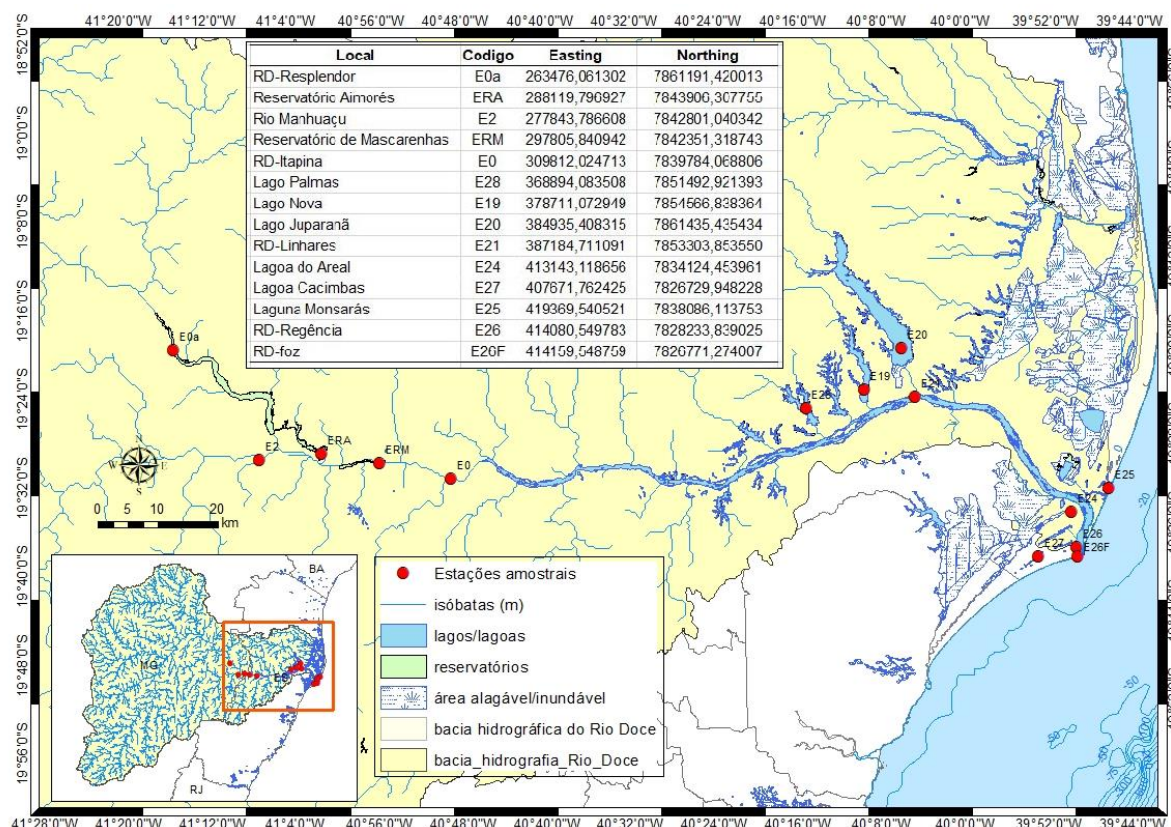
As metas e submetas foram reorganizadas apresentando de forma mais clara os dados que vem sendo avaliados. As submetas: 1- coleta de dados, 3- distribuição espacial e 4- produção de guias fotográficos, foram incluídas na submeta 1.1- composição e distribuição espacial. A submeta 2 – análise de dados foi incluída na submeta 1.2 – estrutura da comunidade. A metodologia foi readequada para incluir os métodos para a quantificação da biomassa e determinação de metais pesados nos tecidos.

6.1. Malha e Frequência Amostral

Para execução das metas 1 e 2, as expedições para coleta de macrófitas aquáticas serão realizadas em dois períodos sazonais, mensalmente no período chuvoso (novembro a março) e bimestralmente no período seco (abril a outubro) ao longo de 18 meses. As plantas serão coletadas utilizando um

quadrado de 1 m² que será lançado, aleatoriamente, oito vezes em cada estação da malha amostral, de forma preestabelecida e referenciada no perímetro da estação, por meio da coordenada geográfica de cada quadrado. Nas estações da calha do Rio Doce serão realizados quatro lançamentos em uma margem e os outros quatro na outra margem. Para efeitos de comparação, as 14 estações amostrais (Figura 5) foram divididas em: calha do rio Doce (E0a – Resplendor, E0 - Itapina, E21 - Porto de Linhares, E26 – Regência, E26F - Foz), lagos (E19 - Nova, E20 - Juparanã, E22 - Palmas), lagoas (E24 - Areal, E25 - Monsarás, E27 - Cacimbas), reservatórios (ERM – Mascarenhas, ERA – Aimorés) e Rio Manhuaçu (E2).

Figura 5: Mapa com localização das estações de monitoramento (Ambiente Dulcícola).



6.2. META 1 - Caracterização da comunidade de macrófitas aquáticas

Os espécimes férteis (frondes para plantas vasculares sem sementes, flores e/ou frutos para as angiospermas) serão coletados com no mínimo de três amostras (sempre que possível) e processados de acordo com os métodos usuais em taxonomia vegetal (Bridson & Forman 1998). As amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Taxonomia Vegetal – Labtax/CCHN/UFES e depositadas no Herbário VIES (Universidade Federal do Espírito Santo). Sempre que possível, amostras adicionais serão coletadas (flores e frutos) e acondicionadas em recipientes adequados e preservadas em álcool etílico 70%, para estudos morfológicos e identificação. Para as plantas vasculares sem sementes, uma amostra será necessariamente coletada e armazenada em álcool 70% (além das três amostras para exsiccatas). Os espécimes coletados serão acompanhados de seus respectivos registros fotográficos e

os dados referentes às coordenadas geográficas obtidos por meio do aparelho de GPS (Global Positioning System).

A identificação dos espécimes será realizada por meio do método comparativo de vouchers depositados em herbários [CVRD, K, MBML, MO, NY, RB, SPF, VIES, acrônimos de acordo com Thiers (2022)] e/ou utilizando-se bibliografias específicas. A lista das espécies seguirá os nomes das famílias botânicas propostas pelo APG IV (2016), para as angiospermas, e Smith et al. (2006), para as plantas vasculares sem sementes. Os nomes dos autores seguirão a Flora e Funga do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do#CondicaoTaxonCP>) e o estado de conservação dos táxons o CNCFlora (2020), para o estado de conservação à nível nacional, e Fraga et al. (2019), para o estado de conservação à nível estadual.

O banco de imagens será utilizado para a confecção de um guia ilustrado de campo (guia fotográfico) com características diagnósticas das espécies, para auxiliar na identificação específica em diagnósticos ambientais rápidos. O guia será confeccionado utilizando a ferramenta de design gráfico gratuita Canva (<https://www.canva.com/>).

A classificação das formas biológicas das macrófitas aquáticas seguirá o proposto por Irgang et al. (1984), sendo as espécies categorizadas como: submersa fixa - enraizadas e que crescem totalmente submersas na água; submersa livre - permanecem flutuando submersas na água; flutuante fixa - são enraizadas e com folhas flutuando na superfície da água; flutuante livre - permanecem flutuando com as raízes abaixo da superfície da água; anfíbia - plantas geralmente de margens; emergentes - enraizadas com folhas emergindo parcialmente; e epífita.

O levantamento da fenologia reprodutiva será realizado durante os lançamentos dos quadrados, sendo realizado concomitantemente com as análises de diversidade. Além disso, será realizado um resgate da fenologia dos materiais coletados desde outubro de 2018, início das campanhas amostrais do PMBA, e incluídos no herbário VIES, para inclusão nas análises de fenologia reprodutiva. Para isso, de acordo com Tannus et al. (2006), será considerada a presença de flores e/ou frutos, além de botões florais e frutos no início de desenvolvimento para as angiospermas, e esporos para as plantas vasculares sem sementes. Quando os espécimes de angiospermas apresentarem flores e frutos concomitantemente, far-se-á o registro de ambas as fenofases nos respectivos meses de ocorrência. Além disso, os registros fenológicos serão classificados quanto ao período sazonal (seco ou chuvoso) e a duração da floração, frutificação e presença de esporos, sendo breve (1 mês), intermediária (2 a 3 meses) e extensa (4 ou mais meses). A data média de floração, frutificação e presença de esporos das espécies, sincronia e o teste de Rayleigh serão calculados no software Oriana 2.0 (Kovach 2004). A inclusão da análise fenológica é importante pois as variáveis ambientais também regularizam as fenofases dos vegetais (e.g. Fonseca et al. 2017), mesmo quando os fatores genéticos são os responsáveis pela existência de periodicidade de desenvolvimento (Richards 1952, Morellato et al. 1989). Além disso, a adição desta análise não impacta a planilha financeira do projeto, já que se trata de observações em campo.

6.3. META 1 - Análise de biomassa

Para a determinação da biomassa, serão utilizados os organismos vegetais que estiverem dentro do quadrado (1m^2) que será lançado no momento de obtenção dos dados de diversidade. As plantas do interior do quadrado serão coletadas manualmente, seguindo a proposta estabelecida por Howard-Williams (1975). O material biológico coletado será lavado com água do próprio ambiente e posteriormente acondicionado em saco plástico e devidamente identificado, sendo as amostras encaminhadas ao Laboratório de Taxonomia Vegetal – Labtax/CCHN/UFES, onde serão triados. Em laboratório o material será separado por espécie, seco em estufa a 65°C e, posteriormente, pesado em balança digital, sendo os valores expressos em gramas de peso seco por metro quadrado (gPS/m^2) e analisados primeiramente de forma individual, considerando o peso seco de cada espécie e posteriormente, o peso seco de cada quadrado, de cada margem e de cada estação amostral estudada no âmbito do PMBA. Subsequentemente, a biomassa de peso seco será transformada em biomassa de carbono, de acordo com Wetzel & Likens (2000), onde foi considerado que 0,47 do peso seco remanescente livre de cinzas são carbono.

6.4. META 2 - Determinação de metais pesados nas macrófitas aquáticas

Serão coletadas manualmente, em cada estação amostral, amostras de raízes e folhas de espécies indicadoras e, posteriormente, as amostras serão armazenadas em sacos plásticos perfurados para o escoamento da água. Previamente, foram estabelecidas as seguintes espécies: *Eichhornia azurea*, *Eichhornia crassipes*, *Salvinia auriculata*, *Salvinia biloba* e *Typha domingensis*, por serem registradas na maioria das estações amostrais, assim, abrangendo os ambientes lóticos e lênticos analisados no âmbito do PMBA. Todo material da mesma espécie coletado no quadrante, será reunido formando duas amostras compostas para cada espécie, uma amostra de raízes e outra de folhas. Em laboratório, o material será inicialmente lavado em água corrente para a eliminação de detritos e matéria orgânica. Posteriormente, se procederá a secagem em estufa de circulação forçada de ar, com temperatura ajustada em 65°C , por um período de 48 horas. Após esse período, todo o material será triturado em moinho, peneirado em malha de 2,0 mm e pesado 0,5 g de amostra de cada estação amostral, em triplicatas. A digestão das amostras e quantificação dos metais pesados (Fe, Al, Mn, Zn, V, Ba, Cd, As) serão realizadas no Departamento de Química da UFMG.

6.5. METAS 1 e 2 - Análises estatísticas

Os parâmetros de diversidade (abundância, riqueza, biomassa, índice de dominância e composição de espécies) e de metais pesados nos tecidos serão comparados tanto espacial (áreas afetadas diretamente X áreas adjacentes) quanto temporalmente (ao longo do período de monitoramento).

Para testar a suficiência amostral total e de cada ambiente (rio Manhuaçu, Lagos, Lagoas, Reservatórios e rio Doce), curvas de rarefação serão confeccionadas reunindo os dados gerais e abundância específica. Para todas as análises relativas aos parâmetros numéricos das comunidades serão construídos modelos lineares generalizados (GLMs), usando-se as distribuições de erros

adequadas em cada caso. As variáveis dependentes (resposta) dos modelos serão abundância, riqueza e índice de dominância e as variáveis independentes (explicativas) serão o local nas análises espaciais e o tempo nas análises temporais, levando em consideração os dos períodos sazonais, chuvoso (Novembro a Março) e seco (Abril a Outubro), levando em consideração os períodos já analisados nos anos anteriores. Todos os modelos, bem como os testes estatísticos, serão construídos/realizados utilizando-se a plataforma R (R Development Core Team 2019). Todas as investigações serão submetidas à análise de resíduos para verificação das distribuições de erro utilizadas, adequação dos modelos e possível presença de 'outliers'.

As análises de composição serão feitas através de estatística multivariada a partir de planilhas de presença X ausência com abundância em cada estação amostral. Serão realizadas análises de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), seguidas de análises de similaridade (ANOSIM) e de porcentagem de contribuição das espécies mais influentes (SIMPER), utilizando-se o índice de similaridade de Bray-Curtis. A realização de testes do tipo SIMPER permitem a identificação de espécies mais "influentes" na separação das comunidades, de maneira que, a partir da biologia de tais espécies, seja possível inferir se a mesma é uma espécie que possa ser apontada como bioindicadora. Tais análises serão realizadas no software Past 2.17 (Hammer et al. 2001).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 181, nº 1, p. 1-20, 2016.

BRIDSON, D. & FORMAN, L. The Herbarium Handbook. Richmond: Royal Botanical Garden, Lubrecht & Cramer Ltd. 348 pag. 1998.

CNCFlora. Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha>. Acesso em 6 julho 2022.

COOK, C.D.K.; GUT, B.J.; RIX, E.M.; SCHENELLER, J.; SEITZ, M. Water plants of the world. The Hague: Junk Publishers. 568 pag. 1974.

FERREIRA, F. A.; POTT, A.; POTT, V. J.; LATINI, R. O.; RESENDE, D. C. Macrófitas aquáticas. In: LATINI, A. O.; RESENDE, D. C.; POMBO, V. B.; CORADIN, L. (Org.). Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: MMA. 659-726 pag. 2016.

FRAGA, C. N., PEIXOTO, A. L., & LEITE, Y. L. R. Lista da fauna e flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. In C. N. Fraga, M. H. Formigoni, & F. G. Chaves (Orgs.), Fauna e flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo (p. 342-419). Santa Teresa, ES: Instituto Nacional da Mata Atlântica. 2019.

FONSECA, D.C.; OLIVEIRA, M.L.R.; PEREIRA, I.M.; CABRAL, M.C.; MOURA, C.C.; MACHADO, E.L.M. Phenological strategies of dioecious species in response to the environmental variations of

rupestrian grasslands. *Cerne* vol. 23(4): 517-527 pag. 2017.

HAMMER, Ø; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, nº 1, p. 1-9, 2001.

HOWARD-WILLIAMS, C. Seasonal and spatial changes in the composition of the aquatic and semiaquatic vegetation of lake Chilwa, Malawi. *Vegetation* vol. 30(1), 33-39 pag. 1975.

INGOLE, N. W; BHOLE, A. G. Removal of heavy metals from aqueous solution by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *AQUA - Water Infrastructure, Ecosystems and Society* vol. 52, p. 119-128 pag. 2003.

IRGANG, B.E.; PEDRALLI, G.; WAECHTER, J.I. Macrófitos aquáticos da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. *Roessleria, Porto Alegre* vol. 6: 395-404 pag. 1984.

JUNIOR, I.B. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas. In: Thomaz, S.M. & Bini, L.M. *Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas*. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 341 pag. Kovács, M. (Ed.). 1992. *Biological Indicators in Environmental Protection*. Tradução de Á. Máthé, Z. Tuba, J. L. Meenks, Zs. Csintalan. Chichester: Ellis Horwood. 125 pag. 2003

KOVACH, W.L. Oriana for Windows, version 2.0. Kovach Computer Services, Pentraeth. 2004.

LIZIERI, C.; AGUIAR, R.; KUKI, K. N. Manganese accumulation and its effects on three tropical aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrrhiza*. *Rodriguésia* vol. 62, 909-917 pag. 2011.

MORELLATO, P.C.; LEITÃO-FILHO, H.F. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian Forest. *Biotropica* vol 28: 180-191 pag. 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em <http://www.R-project.org/> Acesso em 6 setembro 2019.

RICHARDS, P.W. The tropical rain forest: an ecological study. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 1952.

SMITH, A.R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P.G. A classification for extant ferns. *Taxon*, vol. 55, nº 3, p. 705-731, 2006.

TANNUS, J.L.S; ASSIS, M.A.; MORELLATO, L.P.C.; Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de cerrado no sudoeste do Brasil, Itirapina –SP. *Biota Neotropica*, v.6, n.3, 2006.

THIERS, B. [continuously updated]. In: Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. Acesso em 22 maio 2022.

WETZEL, R.G. & LINKENS, G.E. *Limnological analysis*, 3ed. New York. Springer Verlag. Pag. 429. 2000.

PERIFÍTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Valéria de Oliveira Fernandes	Pesquisadora	UFES
Lucineide Maria Santana	Pós-doutorando/co-Pesquisador (deixará a função de Mestre II/ Profissional Pleno)	UFES
Mateus Sardi Trancoso	Profissional Júnior	UFES
Bianka Gerhardt Endlich	Profissional Júnior (a ser removida da função de Técnico Nível Médio)	UFES
A contratar	Técnico Nível Médio	UFES
Isabela Clara Marques Balinhas	Iniciação Científica	UFES
Miguel Ângelo Scardua Filho	Iniciação Científica	UFES

2. ESCOPO

Importantes informações foram geradas nos últimos três anos de monitoramento na bacia do Baixo Rio Doce. Em relação à comunidade perifítica, os principais resultados mostraram que: (i) 1068 táxons de algas perifíticas foram registrados na comunidade, porém ainda é esperado o registro de novas espécies com a realização de novas amostragens, conforme análise de rarefação de espécies, podendo ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade de algas perifíticas nos ambientes amostrados; (ii) forte influência da sazonalidade na comunidade perifítica, principalmente nos ambientes lóticos, com tendência de aumento da diversidade no período seco, o que pode ser explicado pela maior heterogeneidade espacial e instabilidade durante o período chuvoso e maior estabilidade ambiental no período seco, permitindo maior riqueza; (iii) mudanças na estrutura da comunidade, medidas principalmente pela diversidade, sugerem que os ambientes lóticos e as lagoas sejam os ambientes mais impactados pelas concentrações de metais; (iv) especificamente para o Rio Doce, que recebeu cargas de rejeito mais substanciais após o rompimento da barragem, a relação do arsênio com a riqueza de espécies da comunidade pareceu ser uma possível evidência dos efeitos residuais/crônicos desse rejeito de minério (RRDM, 2022). Tais resultados mostram a relevância do monitoramento da comunidade perifítica e suas respostas aos fatores ambientais nos ambientes lênticos e lóticos da região impactada pelos rejeitos de minério de ferro.

Diante do exposto, o presente Plano de Trabalho visa a continuidade do monitoramento da comunidade perifítica, que será analisada em termos de composição, estrutura e biomassa das microalgas, visando a avaliação de sua variação espaço-temporal em 14 estações amostrais de ecossistemas aquáticos continentais da bacia do Baixo Rio Doce, dentro do Programa de Monitoramento da Biodiversidade

Aquática. Espera-se, assim, descrever a variabilidade espacial e ciclo sazonal anual da variação da comunidade para a aplicação de métodos interdisciplinares de avaliação da qualidade ecológica dos ambientes aquáticos da área citada, sendo complementar a outras áreas do conhecimento.

3. OBJETIVO

O presente projeto visa descrever e monitorar a variação espacial e temporal da composição, abundância e biomassa da comunidade de microalgas perifíticas em ecossistemas aquáticos lóticos e lênticos da bacia do Baixo Rio Doce, após o rompimento da barragem de minério de ferro, assim como avaliar a qualidade ecológica dos ecossistemas aquáticos a partir de espécies indicadoras da comunidade perifítica.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

A comunidade perifítica tem grande importância no funcionamento dos ecossistemas aquáticos e pode ser utilizada como ferramenta de monitoramento da qualidade das águas. Dentre as características que fazem com que a comunidade seja boa bioindicadora destacam-se (i) a capacidade de converter muitos compostos inorgânicos em orgânicos; (ii) o modo de vida sésil, juntamente com o curto ciclo de vida, que fazem com que o perifíton responda rapidamente às alterações ocorridas na água; (iii) a riqueza de espécies, se comparado às outras comunidades aquáticas, constituindo rico sistema de informações para o monitoramento ambiental; (iv) a capacidade de acumular grandes quantidades de nutrientes e substâncias poluentes dissolvidos, integrando a qualidade da coluna d'água, e (v) por ser considerado um "ecossistema modelo", já que é adequado para avaliar colonização, sucessão, diversidade e estabilidade de comunidades (Lowe & Pan, 1996). Um dos principais usos dentro do biomonitoramento é a avaliação do estado trófico dos corpos d'água (Almeida & Fernandes 2012, 2013); contudo, o perifíton vem sendo utilizado com sucesso para a avaliação e monitoramento de alterações antrópicas causadas por mineração, desde alterações de pH, até a presença de metais, como o cádmio, chumbo, zinco e ferro (Hill et al., 2000; Besser et al., 2007; DeNicola & Lellock, 2015; McCauley & Bouldin, 2016). Com base no exposto, a comunidade perifítica é então uma importante ferramenta na avaliação dos impactos dos rejeitos de minério de ferro, decorrentes do colapso da barragem de rejeitos de Fundão (Mariana, MG), nos sistemas lacustre e fluvial do Baixo Rio Doce.

META 1 - Avaliação qualitativa da comunidade perifítica

A análise qualitativa visa avaliar a composição algal perifítica nos ambientes lênticos e lóticos, contribuindo na análise quantitativa das espécies e na ampliação do conhecimento da distribuição geográfica das espécies de algas na bacia do Baixo Rio Doce.

META 2 - Avaliação quantitativa da comunidade perífítica

As análises quantitativas visam avaliar a estrutura da comunidade perífítica em termos de abundância e diversidade de espécies nos ambientes lênticos e lóticos. A variação na estrutura da comunidade possibilita verificar as suas respostas às alterações nos fatores ambientais, tais como pH, nutrientes e vazão.

META 3 - Avaliação da biomassa fotossintética da comunidade perífítica

A determinação da concentração de clorofila-a permite expressar a biomassa fotossintética da comunidade perífítica e indica o seu estado fisiológico. A avaliação da variação espacial e temporal da biomassa fotossintética pode indicar a influência da disponibilidade de nutrientes na coluna d'água e no biofilme perífítico, assim como da disponibilidade de luz para a comunidade e de outros fatores controladores, como velocidade da correnteza e predação (Biggs 1996; Casartelli *et al.* 2016).

META 4 - Avaliação do peso seco (PS) e do peso seco livre de cinzas (PSLC) da comunidade perífítica

A análise do PS e do PSLC, também consideradas medidas de biomassa, objetiva avaliar no perífíton a contribuição de material orgânico (proveniente principalmente de algas) e de material inorgânico, que pode ser composto por partículas inorgânicas provenientes de diferentes fontes, tais como solos expostos na bacia e partículas do rejeito da barragem. A variação espacial e temporal do PS e do PSLC também permite avaliar a influência de variáveis físicas, como velocidade da corrente, turbidez e material em suspensão sobre a biomassa perífítica.

META 5 – Seleção de indicadores da comunidade perífítica para avaliação integrada com outros temas do PMBA

A análise e seleção de indicadores serão realizadas a partir da avaliação dos principais padrões na dinâmica espacial e temporal na estrutura da comunidade perífítica e suas relações com fatores ambientais, que podem influenciar direta- ou indiretamente nessa dinâmica. Os indicadores selecionados serão utilizados para uma avaliação integrada com variáveis geradas neste e em outros temas do PMBA.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS

(Listar os dados que serão entregues como produto, tanto os coletados in

RESPONSÁVEL

(Pessoal Vinculado)

<i>situ como os processados no laboratório)</i>	
- Riqueza de táxons de microalgas perifíticas; - Abundância de espécies perifíticas; - Índices de diversidade (Shannon, equitabilidade, e dominância de Simpson); - Concentração de clorofila-a do perifíton; - Peso seco e peso seco livres de cinzas do perifíton.	Valéria de Oliveira Fernandes

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 23º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- Análise da variação espacial e temporal da estrutura, composição e biomassa da comunidade perifítica ao longo do trecho capixaba do Baixo Rio Doce e de lagos e lagoas adjacentes; - Análise das possíveis espécies indicadoras de degradação ambiental e de poluição por metais pesados. - Análises estatísticas multivariadas.	Valéria de Oliveira Fernandes

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

As amostras da comunidade perifítica serão coletadas mensalmente (período chuvoso -outubro a março) e bimestralmente (período seco - maio a setembro), no período de 23 meses, em 14 estações de amostragem ao longo do Baixo Rio Doce (Figura 6 e Tabela 3). Em cada uma das estações amostrais localizadas em ambientes lóticos, serão coletadas amostras de perifíton em uma das margens. Nas estações amostrais de ambientes lênticos (lagoas, lagos, laguna, reservatórios), a comunidade perifítica será coletada na região litorânea, uma vez que esta comunidade não se desenvolve na região pelágica de ambientes mais profundos.

Figura 6: Malha amostral do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.

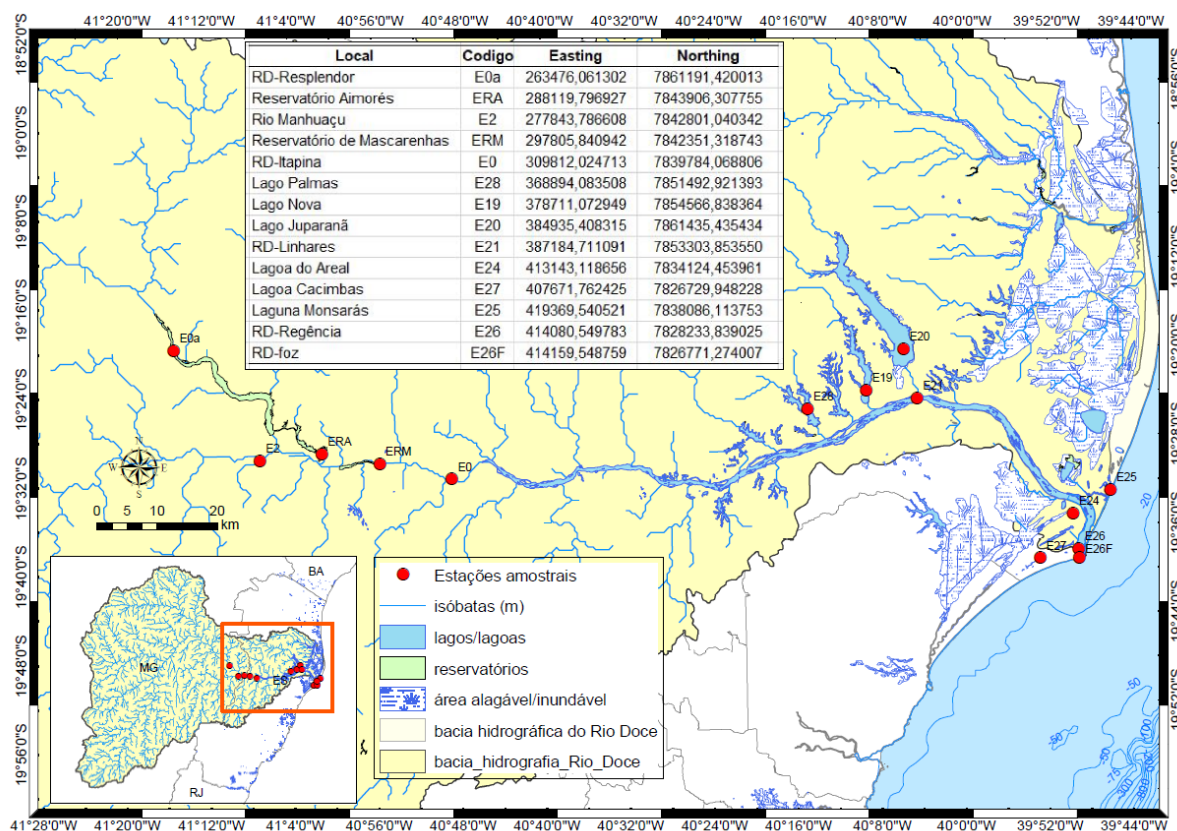


Tabela 3: Coordenadas UTM (datum SIRGAS 2000) das estações amostrais do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.

Local	Código	Easting	Northing
RD-Resplendor	E0a	263476,061302	7861191,420013
Reservatório Aimorés	ERA	288119,796927	7843906,307755
Rio Manhuaçu	E2	277843,786608	7842801,040342
Reservatório de Mascarenhas	ERM	297805,840942	7842351,318743
RD-Itapina	E0	309812,024713	7839784,068806
Lago Palmas	E22	368894,083508	7851492,921393
Lago Nova	E19	378711,072949	7854566,838364
Lago Juparanã	E20	384935,408315	7861435,435434
RD-Linhares	E21	387184,711091	7853303,853550
Lagoa do Areal	E24	413143,118656	7834124,453961
Lagoa Cacimbas	E27	407671,762425	7826729,948228
Laguna Monsarás	E25	419369,540521	7838086,113753
RD-Regência	E26	414080,549783	7828233,839025
RD-foz	E26F	414159,548759	7826771,274007

RD: Rio Doce

6.2. METAS 1, 2, 3 e 4 - Amostragem da comunidade perifítica

Em cada uma das estações amostrais serão coletadas, no mínimo, três unidades de um tipo de substrato (a quantidade de substratos coletados deverá conter quantidade de material suficiente para os procedimentos analíticos). O tipo de substrato escolhido deverá ser comum às estações amostrais. Contudo, existe grande heterogeneidade espacial na Bacia do Rio Doce, e os substratos podem não estar presentes em todas as estações amostrais. De modo a manter o mesmo substrato sempre que possível, a escolha do substrato deverá seguir esta ordem: seixos (ou rochas), macrófitas fixas (enraizadas), e macrófitas flutuantes. No caso do uso de macrófitas, deverão ser selecionadas aquelas mais abundantes ao longo das estações amostrais. Os substratos deverão ser coletados de forma que a área colonizada pelo perífiton possa ser determinada após a remoção do mesmo. No caso de substratos vivos (e.g., macrófitas), deverá ser observada a idade do substrato, sendo que estes devem ter aproximadamente a mesma idade (para evitar efeitos da sucessão nas análises) e não estarem em senescência (que também pode influenciar na estrutura da comunidade). Os substratos coletados deverão ser armazenados em frascos com pequena quantidade de água destilada (formando uma câmara úmida), em baixa temperatura, até serem levados ao laboratório, onde serão raspados com escova de cerda macia e jatos de água destilada. Em cada estação amostral (ou região da estação amostral), deverá ser coletada uma quantidade de material perifítico suficiente para as análises qualitativa, quantitativa, da biomassa fotossintetizante e do peso seco.

6.3. METAS 1, 2, 3 e 4 - Análises qualitativa, quantitativa, da biomassa, do peso seco e do peso seco livre de cinzas da comunidade perifítica

Após a raspagem, as amostras para a análise qualitativa da comunidade serão fixadas com solução formalina a aproximadamente 4% (4 ml de solução formalina para cada 100 ml de amostra). A análise taxonômica será realizada em microscópio óptico equipado com câmera fotográfica e câmara clara. Para a análise taxonômica das diatomáceas, parte do material perifítico será oxidado, segundo Battarbee *et al.* (2001), utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 35%) e ácido clorídrico (HCl 10%). As lâminas permanentes serão montadas utilizando Naphrax[®] (*IR* = 1,73) como meio de inclusão. Para a análise quantitativa, as amostras serão fixadas com solução de lugol acético 1%. A análise da densidade perifítica será realizada em microscópio invertido (segundo Utermöhl 1958), com tempo de sedimentação segundo Lund *et al.* (1958). A contagem será realizada em campos aleatórios (Uelinger 1964), e o limite de contagem será determinado pela curva de rarefação de espécies (quando nenhuma espécie nova for observada em pelo menos cinco campos analisados) e de no mínimo 100 indivíduos da espécie mais comum em determinada amostra (Ferragut *et al.* 2013). A partir dos dados quantitativos, será avaliado a diversidade da comunidade perifítica a partir dos índices de Shannon, equitabilidade, e dominância de Simpson (MAGURRAN, 2004).

O peso seco (PS) e o peso seco livre de cinzas (PSLC) da comunidade perifítica serão determinados pelo método de pesagem e seguirão os procedimentos descritos em APHA (2005). A biomassa algal

(representado pela clorofila-a, corrigida da feofitina) será determinada pelo método de extração em etanol 90% aquecido, sem maceração (Sartory & Grobelaar 1984) e os cálculos baseados em Golterman et al. (1978).

6.4. META 5 - Análise de indicadores da comunidade perifítica

A partir da análise da dinâmica espacial e temporal na estrutura da comunidade perifítica, indicadores, tais como riqueza e diversidade de espécies e contribuição (%) de material inorgânico, serão selecionados e análises estatísticas serão realizadas para verificar suas relações com fatores ambientais, que podem influenciar a dinâmica da comunidade. A seleção dos indicadores da comunidade será embasada por publicações científicas especializadas. Os resultados sobre os fatores ambientais nos ambientes monitorados, tais como, vazão e velocidade da corrente, concentração de nutrientes e metais pesados, serão fornecidos por outras equipes do PMBA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, S.Z.; Fernandes, V.O. Effects of intensive fish-farming and domestic wastewater on the periphytic algal community in a tropical coastal lagoon (Juara, Brazil). **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 35, p. 335-342, 2013.

Almeida, S.Z.; Fernandes, V.O. Periphytic algal biomass in two distinct regions of a tropical coastal lake. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, p. 244-254, 2012.

APHA, American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st edition. APHA, Washington, DC, 2005.

Battarbee, R. W.; Jones, V.; Flower, R. J.; Cameron, N.; Bennion, H.; Carvalho, L.; Juggins, S. Diatoms. In: Smol, J. P.; Birks, H. J. B.; Last, W. M. (eds.). **Tracking Environmental Change Using Lake Sediments**. London: Kluwer Academic Publishers. v. 3. p. 155-203, 2001.

Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., May, T.W. et al. Biomonitoring of Lead, Zinc, and Cadmium in Streams Draining Lead-Mining and Non-Mining Areas, Southeast Missouri, USA. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 129, p. 227-241, 2007.

Biggs, B.J.F.; Kilroy, C. **Stream periphyton monitoring manual**. New Zeland, Niwa, 2000.

Biggs, B.J.F. Patterns in benthic algae of streams. In: Stevenson, R.J.; Bothwell, M.L.; Lowe, R.L. (eds.). **Algal Ecology: freshwater benthic ecosystems**. San Diego: Academic Press, p. 31-56, 1996.

Casartelli, M.R., Lavagnolli, G.J.; Ferragut, C. Periphyton biomass accrual rate changes over the colonization process in a shallow mesotrophic reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 28 (e9), 2016.

DeNicola, D.M.; Lellock, A.J. Nutrient limitation of algal periphyton in streams along an acid mine drainage gradient. **Journal of Phycology**, v. 51, p. 739–749, 2015.

Fernandes, V.O. **Variação temporal da estrutura e dinâmica da comunidade perifítica em dois tipos de substrato na Lagoa Imboassica, Macaé (RJ)**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 198 p., 1997.

Ferragut, C., Bicudo, D.C.; Vercellino, I.S. Amostragem e medidas de estrutura da comunidade perifítica. In: Schwarzbald, A.; Burliga, A.L.; Torgan, L. C. (eds.). **Ecologia do perifíton**. Rima, São Carlos, p. 157- 177, 2013.

Golterman, H. L.; Clymo, R. S.; Ohnstad, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh waters**. 2ª ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications. International Biological Program, 1978.

Hill, B.H., Willingham, W.T., Parrish, L.P. et al. Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. **Hydrobiologia**, v. 428, p. 161-169, 2000.

Lowe, R. L.; Pan, Y. Benthic alga communities as biological monitors. In: Stevenson, J. R., Bothwell, M. L.; Lowe, R. L. (eds.). **Algal ecology: freshwater benthic ecosystems**. New York: Academic Press, p. 705-739, 1996.

Lund, J.W.G.; Kipling, C.; Le-Cren, E.D. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. **Hydrobiologia**, v. 11, p. 143-170, 1958.

Magurran, A. E. **Medindo a diversidade biológica**. Editora UFPR, Curitiba, 261 p., 2011.

McCauley, J.R.; Bouldin, J.L. Cadmium Accumulation in Periphyton from an Abandoned Mining District in the Buffalo National River, Arkansas. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, p. 757-761, 2016.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual 2021 do PMBA/Fest-RRDM. Evolução espaço temporal na qualidade ambiental e na biodiversidade no ambiente dulcícola. RT-39B, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 613 pag. 2022.

Sartory, D.P.; Grobbelaar, J.E. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, p. 177-187, 1984.

Stevenson, J.R. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. In: Stevenson, J. R.; Bothwell, M. L.; Lowe, R. L. (Eds.). **Algal ecology: freshwater benthic ecosystems**. New York, Academic Press, p. 3-30, 1996.

Uehlinger, V. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Archives des Sciences**, v. 17, p. 121-123, 1964.

Utermohl, H. Zur Vervollkommen der quantitative phytoplankton: metodik. **Mitteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie**, v. 9, p. 1-38, 1958.

Wetzel, R.G. Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators. **Verhandlungen des**

Internationalen Verein Limnologie, v. 24, p. 6-24, 1990.

Wetzel, R.G. Opening remarks. In: Wetzel, R.G. (Ed.). **Periphyton of freshwater ecosystems**. The Hague, Dr. W. Junk Publishers, p. 339-346, 1983.

FITOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Alessandra Delazari Barroso (Doutor II)	Pesquisadora	FAESA
Fabício Bronzoni de Oliveira	Mestre I	UFES
Larissa Bassani de Oliveira Viganor	Mestre I	UFES
Amanda Martins Batista	Profissional Júnior	UFES
Maria Caroline Gava	Profissional Júnior	UFES
A contratar	Bolsista de IC	UFES
A contratar	Bolsista de IC	UFES
A contratar	Bolsista de IC	UFES

2. ESCOPO

O monitoramento da comunidade fitoplanctônica, no âmbito do PMBA, vem evidenciando algumas características que necessitam de atenção. A perda de diversidade e a presença de cianobactérias possivelmente tóxicas evidenciam a necessidade de monitoramento constante com a finalidade de avaliar a saúde da comunidade fitoplanctônica da região. Sendo assim, o monitoramento será realizado com coletas mensais ao longo de 18 meses em 14 estações amostrais localizadas na região do baixo rio Doce. A comunidade será avaliada pela composição de espécies, diversidade, densidade e biomassa. Serão analisadas também sua variação espaço-temporal e a avaliação da relação da qualidade da água com a saúde pública, relacionada à ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas, como descritos nos itens a seguir.

3. OBJETIVO

Caracterizar a composição específica e a estrutura da comunidade fitoplanctônica através dos parâmetros riqueza, diversidade, equitabilidade, dominância, biomassa (clorofila *a*) e ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 01 - Composição de espécies da comunidade fitoplanctônica.

META 02 - Determinação da dinâmica espaço-temporal da comunidade fitoplanctônica em relação aos seus principais atributos/índices ecológicos: riqueza, densidade, diversidade, equitabilidade e dominância.

META 03 - Determinação da densidade de células de cianobactérias.

META 04 - Registro de ocorrência de espécies de cianobactérias já identificadas como potencialmente produtoras de toxinas em outros ecossistemas aquáticos brasileiros.

As microalgas são consideradas excelentes bioindicadores da qualidade da água e seu estado trófico, pelo fato de serem espécies de ampla distribuição, por respondem de forma rápida às variações ambientais (Casé *et al.*, 2008), além de poder acumular inseticidas, herbicidas e metais pesados (Anagnostidis & Economou-Amilli, 1980). Assim, espécies fitoplanctônicas podem indicar o grau de poluição de determinado ecossistema, pois algumas espécies com tolerância se adaptam ou são beneficiadas pela poluição e outras são sensíveis às mudanças na qualidade das águas e podem ser eliminadas, causando mudanças na diversidade de espécies. Esse parâmetro pode indicar o grau de estresse a que um ambiente é submetido, principalmente por ações antrópicas.

O plâncton fotossintetizante, principalmente cianobactérias, é positivamente influenciado pela disponibilidade de ferro no ambiente. A baixa disponibilidade de ferro tem sido reportada como um fator limitante para as cianobactérias (Hyenstrand *et al.*, 2000), e possivelmente para outras espécies do fitoplâncton. Logo, o aumento na disponibilidade de ferro, decorrente de atividades antrópicas como a mineração, pode influenciar positivamente o crescimento das espécies, resultando em florações. Porém, nutrientes necessários em concentrações traço, como o ferro, quando em grandes concentrações, podem provocar efeitos tóxicos ao longo da cadeia trófica, diminuindo a diversidade e abundância de espécies fitoplanctônicas, pequenos invertebrados e peixes (Vuori, 1995).

Logo, estudos que visem caracterizar a comunidade fitoplanctônica qualitativa e quantitativamente são necessários em diagnósticos ambientais ou monitoramentos para subsidiar a tomada de decisões acerca do manejo e recuperação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos e suas bacias hidrográficas.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS

(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)

RESPONSÁVEL
(Pessoal Vinculado)

- Densidade e biomassa do fitoplâncton dulcícola e riqueza de espécies; - Diversidade de Shanon & Wiener, Equitabilidade de Pielou Dominância de Simpson; - Cianobactérias potencialmente tóxicas.	Prof. Dr. Alessandra Delazari-Barroso

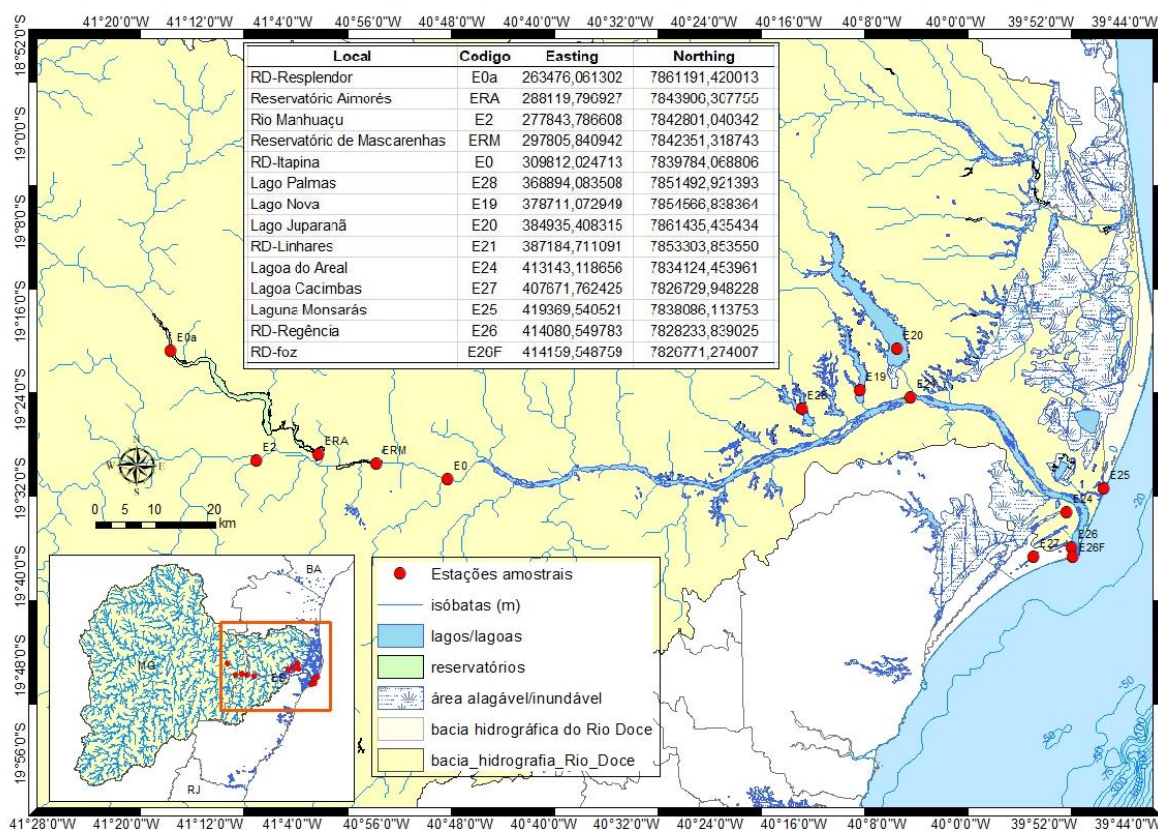
5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
- Análise espaço-temporal da variação da comunidade fitoplanctônica e sua relação com as variáveis físico-químicas da água, principalmente temperatura, pH, condutividade elétrica, luminosidade, concentrações de nitrogênio, fósforo, ferro e clorofila a; - Análise do potencial de produção de toxinas por cianobactérias e relação com a saúde pública.	Prof. Dr. Alessandra Delazari-Barroso

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

As amostras da comunidade fitoplanctônica serão coletadas mensalmente/bimestralmente, em um período de 18 meses, em 14 estações de amostragem ao longo do Rio Doce (região do estado do Espírito Santo) e ecossistemas lacustres adjacentes (Figura 7).

Figura 7: Malha amostral do PMBA nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce.



6.2. META 01 – Análise qualitativa

Para análise qualitativa do fitoplâncton na calha do rio e nos ambientes lacustres, será utilizado o método do arrasto superficial com rede de plâncton de abertura de malha de 20 μm , na subsuperfície (aproximadamente 30 cm de profundidade), sendo uma amostra por ponto amostral. A amostra coletada em cada ponto será dividida em duas partes, acondicionadas em frascos de polietileno (100 ml): uma será fixada com formol 2 - 4% - adicionar 10 mL; o outro frasco deverá ser mantido sem fixador, em caixa térmica com gelo permanente, para análise do material vivo em laboratório (não congelar). As espécies serão analisadas em microscópio óptico Motic Panthera L, equipado com ocular micrometrada e câmara clara. A identificação será realizada ao menor nível taxonômico possível usando bibliografias específicas.

6.3. METAS 2 e 3 – Densidade, biomassa e diversidade do fitoplâncton

Para o estudo quantitativo do fitoplâncton na calha do rio Doce, deverá ser coletada uma amostra de 100 mL de água em cada ponto amostral, submergindo o frasco a 30 cm de profundidade. Nos ambientes lacustres, amostras de 100 mL de água deverão ser coletadas na subsuperfície e na profundidade de 1% da radiação solar incidente na superfície, com garrafa de Van Dorn. Assim, pode-se obter a variação vertical do fitoplâncton nos ambientes lênticos.

Todas as amostras quantitativas (calha do rio e ambientes lacustres) deverão ser acondicionadas em frascos de vidro âmbar (100 mL) e fixadas com solução de lugol acético 5%. A quantificação do fitoplâncton deverá ser realizada pelo método de Utermohl, em microscópio invertido Motic AE2000 em aumento de 400x, usando-se tempo de sedimentação de, pelo menos, 3 horas para cada centímetro de altura da câmara (MARGALEF, 1983). O volume sedimentado por amostra será entre 5 e 25 mL.

A densidade fitoplanctônica (ind.mL^{-1}) será calculada através da seguinte fórmula, descrita por LUND *et. al.* (1958):

$$(\text{ind.mL}^{-1}) = n\{1/[(sch)/1000 \times 100000]\}$$

Onde:

n = número de indivíduos contados

s = área do campo de contagem (μm^2)

c = número campos contados h = altura da câmara (mm)

A diversidade da comunidade fitoplanctônica será determinada através do índice de diversidade de Shannon e Weaver (1949). A equitabilidade será estimada segundo PIELOU (1975) e a dominância será estimada através do índice de SIMPSON (1949). A biomassa do fitoplâncton será estimada através das concentrações de clorofila a, determinadas pela equipe de limnologia dessa proposta.

6.4. METAS 2, 3 e 4 – Densidade, biomassa e diversidade do fitoplâncton

Para as espécies de cianobactérias, será calculado o número médio de células de cada táxon para que seja possível a determinação da densidade de células. Sendo assim, a densidade de células de cianobactérias será dada pela multiplicação da abundância de indivíduos da espécie x pelo seu número médio de células.

A ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas será analisada segundo a lista de espécies tóxicas com ocorrência no Brasil, publicada por SANT'ANNA *et al.* (2008).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTIDIS, Konstantin, ECONOMOU-AMILLI, Athina. Limnological Studies on Lake Pamvotis (Ioannina), Greece, I. Hydroclimatology, Phytoplankton-Periphyton with special reference to the Valency of some microorganisms from sulphureta as bioindicators. **Archiv fur Hydrobiologie**, 89, 3, 313-342, 1980.

CASÉ, Maristela *et al.* Plankton community as an indicator of water quality in tropical shrimp culture ponds. **Marine Pollution Bulletin**, 56, 1343-1352, 2008.

HYENSTRAND, Per, RYDIN, Emil, GUNNERHED, Malin. Response of pelagic cyanobacteria to iron additions - enclosure experiments from Lake Erken. **Journal of Plankton Research**, 22, 6, 1113-1126. 2000.

LUND, John *et al.* The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiology**, 11, 143–170, 1958.

MARGALEF, Ramón. **Limnología**. 1ª ed, Barcelona: Omega, 1010 pag. 1983.

PIELOU, Evelyn. **Ecological diversity**. 1ª ed, New York: Wiley, 165 pag.1975.

SANT'ANNA, Célia. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, 126, 251-265, 2008.

SHANNON, Claude, WEAVER, Warren. **The Mathematical Theory of Communication**. University of Illinois press, Urbana: Illinois, 117 pag. 1949.

SIMPSON, Edward. Measurement of diversity. **Nature**, 163, pag. 688, 1949.

VUORI, Kari-Matti. Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. **Annales Zoologici Fennici**, 32, 317-329. 1995.

ZOOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna	Pesquisadora	UFOP
Edissa Emi Cortez Silva	Celetista – Mestre	UFOP
Leidiane Pereira Diniz	Pós - Doutor	UFOP
Bruna Lana Delfim	Bolsista IC	UFOP
Débora Maria de Oliveira	Bolsista IC	UFOP
Raquel Xavier Calvi	Bolsista IC	UFOP
Sofia de Castro Macedo	Bolsista IC	UFOP

2. ESCOPO

Os organismos zooplanctônicos desempenham um importante papel nos ecossistemas aquáticos, sendo um elemento fundamental entre os produtores primários e demais níveis tróficos (ALLAN 1976). Além disso, possuem uma grande variedade de estratégias ecológicas (LITCHMAN et al. 2013) e funcionam como um excelente modelo para testar hipóteses ecológicas (Frisch et al. 2012). Como possuem ciclo de vida curto e alta eficiência reprodutiva, conseguem responder rapidamente as alterações do ecossistema (GAZONATO-NETO et al. 2014), e por isso, são considerados excelentes bioindicadores da qualidade ambiental (AMSINCK et al. 2007; ATTAYDE & BOZELLI 2011; JEPPESEN et al. 2011; SODRÉ et al. 2015).

Entre as principais tendências observadas a partir do monitoramento do zooplâncton dulcícola realizado entre out/2018 e maio/2022, destacamos uma elevada troca de espécies e de traços funcionais (> diversidade beta) no Rio Doce, especialmente nos últimos anos. Embora esse resultado possa ser visto como positivo, não podemos sugerir indícios de recuperação biológica da calha, uma vez que nesse mesmo ambiente espécies e traços funcionais estão sendo perdidos ao longo do tempo de monitoramento (RRDM, RA2021). Nesse caso, há um “risco ambiental médio” no cenário de perda de funções ecossistêmicas. O risco é enquadrado como médio, pois mesmo diante da simplificação taxonômica e dos traços funcionais, a calha fluvial ainda consegue manter uma elevada diversidade beta (SIMÕES et al. 2020). Além disso, encontramos uma certa estagnação no incremento de formas jovens do zooplâncton na calha fluvial, sugerindo que o zooplâncton estará ainda mais vulnerável diante de impactos ou alterações ambientais.

Diante desse cenário, destacamos que ainda não há elementos para avaliar se o aumento da diversidade beta na calha fluvial é uma resposta positiva na evolução da qualidade ambiental do Baixo Rio Doce após a passagem e a permanência da onda de rejeito de mineração. Como a biota aquática pode apresentar renovação cíclica de espécies, seguindo a dinâmica ambiental (BENINCÀ et al. 2015),

e esse processo pode afetar significativamente a cadeia trófica aquática, o acompanhamento da dinâmica da comunidade zooplanctônica em escalas temporais maiores fornece importantes dados sobre tendências gerais dos ecossistemas aquáticos, possibilitando a compressão dos processos ecológicos na área afetada pela passagem do rejeito.

Nesse novo ciclo de trabalho esperamos consolidar as tendências temporais e espaciais detectadas na comunidade zooplanctônica no Baixo Rio Doce. Por isso, pretendemos continuar analisando o processo de evolução da comunidade através da composição, distribuição quantitativa das espécies, diversidade beta taxonômica e funcional, tamanho, recrutamento e biomassa do zooplâncton. Essas métricas são importantes preditores dos impactos ambientais e sua interpretação pode auxiliar em medidas de conservação e restauração baseadas em aspectos reais dos ecossistemas afetados e comunidades-alvo (LITCHMAN et al. 2013; CHASE et al., 2020). Além de considerar a própria identidade das espécies (abordagem taxonômica), pretendemos continuar utilizando as funções ecológicas desempenhada pelas espécies – abordagem funcional – que vem ganhando destaque nos últimos anos por ser mais sensível na detecção de mudanças ambientais em relação à abordagem taxonômica. Além disso, a diversidade funcional fornece uma melhor compreensão do funcionamento dos ecossistemas, dos processos que estruturam suas comunidades e dos efeitos sobre bens e serviços (LITCHMAN et al. 2013; DINIZ et al. 2021; SANTOS et al. 2022).

3. OBJETIVO

O projeto tem como principal objetivo (i) verificar a riqueza, composição, diversidade beta taxonômica e funcional, recrutamento e biomassa do zooplâncton em 12 estações amostrais nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce, constante no Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA). Além de (ii) contabilizar o número de indivíduos jovens para avaliar se o zooplâncton mantém ativo seu padrão de recrutamento (ingresso de novos indivíduos); (iii) verificar as tendências temporais nos atributos da comunidade zooplanctônica ao longo dos anos do monitoramento e (iv) realizar análises integrativas entre o zooplâncton e os descritores ambientais (parâmetros geoquímicos, limnológicos e comunidade fitoplanctônica) para compreensão dos impactos crônicos da passagem do rejeito na comunidade.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 - Monitoramento e avaliação da estrutura da comunidade zooplanctônica nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce (ES)

Nesse novo ciclo, manteremos a avaliação da estrutura da comunidade, verificando a riqueza, a composição, a equitabilidade, a diversidade, recrutamento e a biomassa ($\mu\text{g.peso seco.L}^{-1}$), uma vez

que esses aspectos mais gerais da comunidade funcionam como importantes preditores dos impactos ambientais e sua interpretação pode auxiliar em medidas de conservação e seleção de abordagens de restauração ecológica.

META 2 - Avaliação do recrutamento da comunidade zooplanctônica nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce (ES)

Em geral, os organismos zooplanctônicos se deparam com várias demandas conflitantes “trade-offs” ao longo de sua história de vida, sendo uma das vantagens de investir em reprodução e alcançar o recrutamento, é conseguir manter populações estáveis mesmo diante de altas taxas de predação ou grande variações ambientais (LITCHMAN et al. 2013). Assim, tendência de redução no incremento de formas juvenis pode sugerir que o zooplâncton estará ainda mais vulnerável diante de impactos ou alterações ambientais. Por isso, a avaliação da presença de larvas e formas imaturas como descritores do ingresso de novos indivíduos para a comunidade zooplanctônica funcionará como um importante indicador da saúde ambiental da área estudada.

META 3 – Determinação de tendências temporais do zooplâncton do Baixo Rio Doce (ES)

Padrões relacionados à dinâmica temporal têm sido negligenciados em muitos estudos ecológicos. Entretanto, para monitorar uma comunidade após algum impacto ambiental é fundamental considerar escalas temporais de longo prazo, permitindo a compressão da sucessão ecológica e no estabelecimento de medidas de conservação e restauração mais precisas. Por isso, avaliaremos as tendências temporais nos atributos da comunidade zooplanctônica do Baixo Rio Doce, inclusive considerando a diversidade beta taxonômica e funcional.

META 4 – Avaliação integrativa da comunidade zooplanctônica e descritores ambientais do Baixo Rio Doce (ES)

Será avaliada a influência de metais e aspectos limnológicos (além de outras variáveis) sobre aspectos estruturais, notadamente riqueza e diversidade funcional do zooplâncton, nos diversos ecossistemas analisados (reservatórios, calha fluvial, lagos e lagoas). Isso facilitará a interpretação dos resultados nos próximos anos do monitoramento.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)

- Densidade (ind.L⁻¹) e abundância das espécies; - Riqueza, equitabilidade e diversidade de espécies; - Diversidade taxonômica e funcional - Recrutamento de indivíduos; - Biomassa (µg.Peso Seco.L⁻¹).	Profa. Dra. Eneida M. Eskinazi Sant'Anna

5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
- Análise espaço-temporal da composição de espécies zooplancônicas e da distribuição quantitativa das comunidades (espécies dominantes, espécies raras, categorias funcionais dominantes - micro, meso ou macrozooplâncton); - Avaliação da diversidade taxonômica e funcional, considerando o grau de uniformidade da comunidade e riqueza, através de índices quantitativos; - Análise da biomassa zooplancônica em função das espécies dominantes e categorias de tamanho predominantes; - Investigação dos indicadores que sugerem o recrutamento de indivíduos na comunidade zooplancônica através da presença de formas jovens, como parâmetro indicador da qualidade do habitat dulcícola; - Análise integrativa de dados bióticos e abióticos para a elaboração de modelos descritivos e preditivos que auxiliem na identificação de impactos crônicos da presença de rejeito.	Profa. Dra. Eneida M. Eskinazi Sant'Anna

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

As amostragens serão realizadas em 14 ambientes do Baixo Rio Doce (ver Figura 8 e Tabela 4). Quanto a frequência amostral, no período seco a amostragem será realizada de forma bimestral (Ano 4: agosto e setembro/2022; Ano 5: maio, julho e setembro/2023), enquanto que no período chuvoso serão realizadas mensalmente (Ano 5: novembro/2022 a março/2023; Ano 6: novembro/2023).

Figura 8: Localização dos pontos amostrais no Baixo Rio Doce, Espírito Santo.

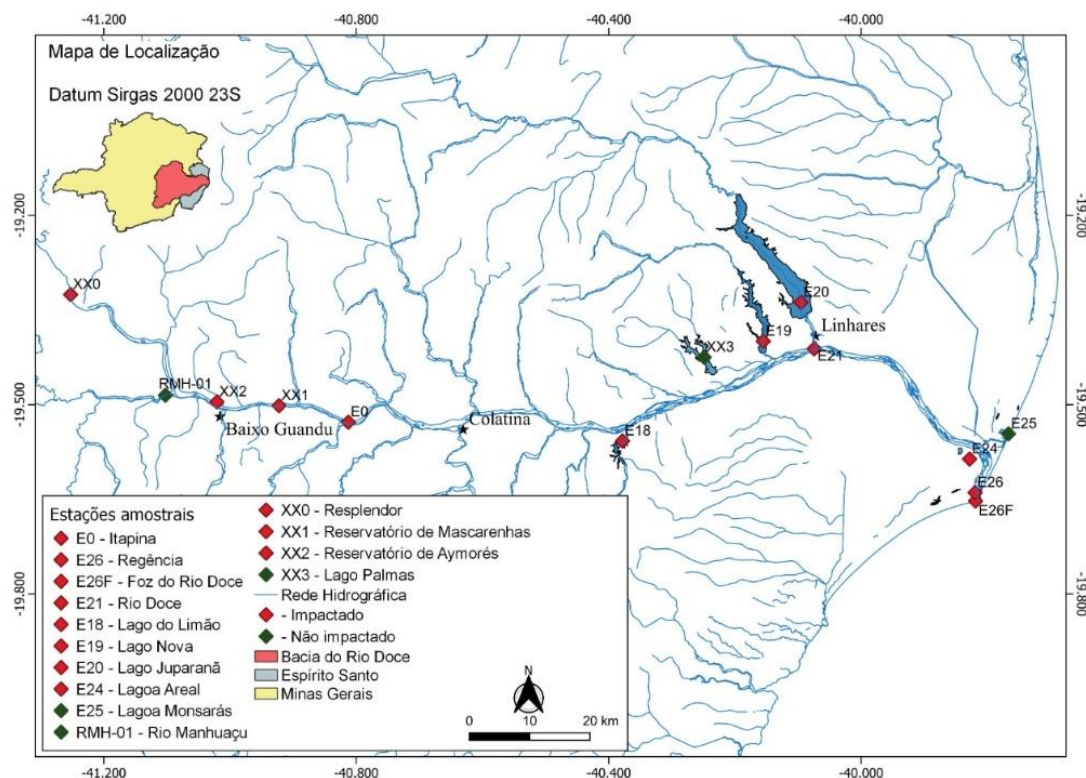


Tabela 4: Pontos amostrais propostos para o novo ciclo do PMBA.

Código	Ambiente	Condição	Número Estações Amostrais	Coordenadas UTM (Zona 23K) DATUM SIRGAS2000	
RMH-01	Rio Manhuaçu (MG)	Não impactado	1	280205	7844306
XX1	Reservatório Mascarenhas	Impactado			
XX2	Reservatório Aymorés	Impactado	1		
E0	Rio Doce/Itapina	Impactado	1	7837362	410065
E21	Rio Doce/Linhares	Impactado	1	7853303	387184
E26	Rio Doce/Regência	Impactado	1		
E26F	Rio Doce/Foz	Impactado	1	7828233	414080
XX3	Lago Palmas (ES)	Não Impactado	3	A definir	A definir
E19	Lago Nova (ES)	Impactado	3	7852636	378757
E20	Lago Juparanã	Impactado	3		
E25/E25A	Lagoa Monsarás (ES)	Não Impactado	3	7837166	415915

E	Lagoa Areal	Impactado	3	7861435,4 4	384935,41
XXX	Lagoa Cacimbas	Impactado	3		

6.2. Etapas de campo e laboratoriais

6.2.1. Amostragem quantitativa

O zooplâncton será coletado em estações amostrais nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce, na região litoral (exceto para os reservatórios) e limnética (perfil vertical de atenuação luminosa). Inicialmente será determinada a profundidade máxima local e a extensão da zona fótica. Para cada amostra serão filtrados 50 litros de água em rede de plâncton com abertura de malha de 68 µm. Antes da preservação com formol neutralizado (na concentração de 4%), os organismos serão anestesiados com adição de água tônica (5ml), para evitar a contração de espécimes (Pinto-Coelho, 2004).

6.2.2. Amostragem qualitativa

Para obter os dados qualitativos, as amostras de zooplâncton serão coletadas com arraste horizontal e oblíquo, com rede de 68 µm de abertura de malha, e preservadas com formol neutralizado a 4%.

6.2.3. Análise das amostras em laboratório

Para a análise quantitativa do zooplâncton serão analisadas subamostras de 1ml em câmara de Sedgwick-Rafter e microscópio óptico equipado com ocular milimétrica. No mínimo 100 organismos devem ser contados por amostra (erro de aproximadamente $\pm 20\%$), valor aceitado dentro dos parâmetros de pesquisas zooplânctônicas (POSTEL et al. 2000). As amostras qualitativas serão utilizadas para identificação das espécies ao menor nível taxonômico possível, através de literatura especializada.

6.3. Análise dos dados

6.3.1. Meta 1 e Meta 2 – Estrutura e recrutamento do zooplâncton

Serão obtidos os dados de densidade (ind.L^{-1}), riqueza, diversidade (H'), tamanho corporal, bem como a estimativa de recrutamento de indivíduos jovens. Além disso, serão construídas curvas de acumulação de espécies para avaliar a eficiência amostral para cada um dos ambientes estudados. O zooplâncton também será categorizado de acordo com sua constância de ocorrência, onde constante será a espécie que possuir evidência em mais de 50% das amostras; acessória será a espécie que estará presente em 25 a 50% das amostras; e a acidental, em menos de 20% das amostras (DAJOZ 1973).

Para determinar a biomassa, inicialmente serão medidos cerca de 20 indivíduos aleatoriamente para cada ponto amostral, em microscópio óptico. Após isso, a biomassa será obtida com base no método alométrico, que consiste no uso de equações exponenciais, as quais relacionam dimensões lineares dos organismos e seu peso seco, por meio de regressões entre o comprimento do animal (µm) vs. o seu peso individual. As fórmulas a serem utilizadas são:

$$B = a.L^b e$$

$$\ln B = c + b.\ln L$$

Onde $c = \ln a$ e “a” e “b” são coeficientes específicos para cada espécie zooplancônica (Pinto-Coelho, 2004).

A equitabilidade será expressa pelo *Índice de Pielou*:

$$J' = [H'(\text{observado}) / H'(\text{máximo})]$$

Para os cálculos dos índices de diversidade, o algoritmo será selecionado de acordo com a estrutura dos dados.

6.3.2. Meta 3 – Diversidade beta taxonômica e funcional e tendências temporais

A diversidade beta pode ser definida como a variação na composição das espécies (abordagem taxonômica) ou dos traços (abordagem funcional, que considera as funções que as espécies desempenham no ambiente) ao longo do espaço ou do tempo. Essas duas abordagens são importantes em estudos de conservação uma vez que podem dar indícios da estrutura e aspectos funcionais da comunidade sob uma ótica espacial e das condições ambientais. Para calcular a diversidade beta taxonômica e funcional será utilizado um teste baseado na dissimilaridade média de cada unidade amostral ao centróide daquele grupo no espaço multivariado (PERMDISP), através de uma matriz de distância.

A diversidade funcional representa as diferenças entre as espécies baseada na distinção de suas características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. Espera-se que altos valores de diversidade funcional estejam relacionados com uma melhor utilização dos recursos disponíveis e funcionamento ecossistêmico (SOBRAL & CIANCIARUSO 2012). Serão determinados traços funcionais como longevidade (curta e longa, até 30 dias e maior que 30 dias de vida, respectivamente), capacidade de escape (ausente, intermediário e longo), tamanho (pequeno e grande, $< 450 \mu\text{m}$ e $> 450 \mu\text{m}$, respectivamente) e estratégias de alimentação (rotíferos filtradores e supensívoros, cladóceros raspadores, copépodes filtradores, rotíferos filtradores, cladóceros filtradores e copépodes raptorais). As tendências temporais nos atributos da comunidade serão testadas usando modelos aditivos de efeitos mistos generalizados (GAMM; função "gam4", R software).

6.3.3. Meta 4 – Relação entre os dados bióticos e os descritores ambientais

Serão construídos modelos gerais para avaliar a relação entre os atributos da comunidade zooplancônica e os descritores ambientais (parâmetros geoquímicos, limnológicos e fitoplâncton) nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce. Isso será feito para auxiliar na compreensão dos impactos crônicos da passagem do rejeito no zooplâncton. Modelos de normalidade também serão utilizados na análise exploratória dos dados.

Todas as análises estatísticas considerarão um nível de significância menor que 0,05 e serão realizadas no programa R (R Core Team, 2019).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN J.D. The University of Chicago Life History Patterns in Zooplankton. **The American Society of Naturalists**, 110, 165–180, 1976.

AMSINCK S.L., JEPPESEN E., VERSCHUREN D., 2007. Use of Cladoceran Resting Eggs to Trace Climate-driven and Anthropogenic Changes in Aquatic Ecosystems. **Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use**. Springer, Dordrecht, 135-157.

ATTAYDE J.L., BOZELLI R.L. Assessing the indicator properties of zooplankton assemblages to disturbance gradients by canonical correspondence analysis. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 55(8), 1789-1797, 2011. <https://doi.org/10.1139/cjfas-55-8-1789>

BENINCÀ E., BALLANTINE B., ELLNER S.P., HUISMAN J. Species fluctuations sustained by a cyclic succession at the edge of chaos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112, 6389–6394, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421968112>.

CHASE J.M., JELIAZKOV A., LADOUCEUR E., VIANA D.S. Biodiversity conservation through the lens of metacommunity ecology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1469, 86–104, 2020. <https://doi.org/10.1111/nyas.14378>

DAJOZ R., 1973. **Ecologia geral: Vozes Petrópolis**. Universidade de São Paulo, São Paulo,

DINIZ L.P., BRAGHIN L.S.M., PINHEIRO T.S.A., MELO P.A.M. C., BONECKER C.C. MELO JÚNIOR M. Environmental filter drives the taxonomic and functional β -diversity of zooplankton in tropical shallow lakes. **Hydrobiologia**, 848, 1881-1895, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04562-5>

FRISCH D., COTTENIE K., BADOSA A., GREEN A.J. Strong spatial influence on colonization rates in a pioneer zooplankton metacommunity. **Plos one**, 7, 1–10, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040205>

GAZONATO-NETO A.J., SILVA L.C., SAGGIO A.A., ROCHA O. Zooplankton communities as eutrophication bioindicators in tropical reservoirs. **Biota Neotropica**, 14, 1-12, 2014. <https://doi.org/10.1590/1676-06032014001814>

Jeppesen E., Nørges P., Davidson T.A., Haberman J., Nørges T., Blank K., Lauridsen T. L., Søndergaard M., Sayer, C., Laugaste R., Johansson L.S., Bjerring R., Amsinck S.L. Zooplankton as indicators in lakes - a plea for including zooplankton in the ecological quality assessment of lakes according to the European Water Framework Directive (WFD). **Hydrobiologia**, 676, 270-297, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0831-0>

LITCHMAN, E., OHMAN, M.D., KIØRBOE, T. Trait-based approaches to zooplankton communities. **Journal of Plankton Research**, 35, 473-484. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt019>, 2013.

PINTO-COELHO R.M. Métodos de coleta, preservação, contagem e determinação de biomassa em zooplâncton de águas epicontinentais. Amostragem em limnologia. In: BICUDO C.E.M., BICUDO D.C. (Eds.) **Amostragem em Limnologia**. (pp. 149-165). São Carlos, São Paulo, 2004.

POSTEL L., FOCK H., HAGEN W. Biomass and abundance. In: HARRIS, R.P., WEIBE P.H., LENZ J., SKJOLDAL H.R., HUNTLEY M. (Eds.) **ICES Zooplankton methodology manual**. (pp. 83-192). Academic Press, London, U.K, 2000.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2019.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Evolução espaço temporal na qualidade ambiental e na biodiversidade no ambiente dulcícola. RT-39B, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 613 pag. 2021.

SANTOS G.S., SILVA E.E.C., BARROSO G.F., PASA V.M.D., ESKINAZI-SANT'ANNA E.M. Do metals differentiate zooplankton communities in shallow and deep lakes affected by mining tailings? The case of the Fundão dam failure (Brazil). **Science of The Total Environment**, 806, 150493, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150493>

SIMÕES, N.R., BRAGHIN, L.M.S., DURE, G.A., SANTOS, J.S., SONODA, S.L., BONECKER, C.C., Changing taxonomic and functional β -diversity of cladoceran communities in Northeastern and South Brazil. **Hydrobiologia** 847, 3845-3856. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04234-w>, 2020.

SOBRAL F., CIANCIARUSO M. Estrutura filogenética e funcional de assembleias: (re) montando a Ecologia de Comunidades em diferentes escalas espaciais. **Bioscience Journal**, 28, 617-631, 2012.

ICTIOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dr. Jorge Abdala Dergam	Coordenador	UFV
Msc. Gustavo Ribeiro Roa	Coordenador de Sub-projeto de ictioplâncton	PUC MINAS / Life Fish
Dra. Andréa Bialezki	Coordenação Científica do sub-projeto de ictioplâncton	Nupélia UEM/Life Fish
Msc Guilherme Moreira Santos	Gestão de logística e atividade de campo	PUC MINAS / Life Fish
Bióloga Mara Luiza	Processos laboratoriais e atividades de campo	Life Fish
Dr. Thoma Hrbek	Identificação molecular dos ovos e larvas	UFAM

2. ESCOPO

Durante o Ano 3 do monitoramento de ictioplâncton no baixo rio Doce as estações de amostragem da calha do rio Doce concentraram as maiores densidades de ovos e larvas de peixes, sendo responsável por 100% dos ovos o que indica que a calha do rio é o principal local de desova. O ponto de amostragem P1, localizado a montante da UHE Mascarenhas, foi o único a apresentar densidade de ovos significativamente inferior a todos os demais na calha do baixo rio Doce o que indica que as desova não ocorrem a jusante desta usina. Entretanto, tais diferenças não foram sincrônicas em relação à densidade de larvas, ou seja, existe deriva de larvas oriundas provavelmente dos afluentes a montante desta localidade. Os principais afluentes a montante da estação P1 é o rio Guandu e o rio Mascarenhas. O rio Guandu não apresentou reprodução significativa, o que reforça a necessidade de se estudar o rio Manhuaçu como possível local de desova nesse trecho.

Uma maior atividade reprodutiva dos peixes ocorreu entre os meses de dezembro e janeiro, diminuindo gradativamente até o final do período chuvoso. No período seco, as proporções de ovos se tornaram mais expressivas a partir do mês de abril com pico de ocorrência em agosto, enquanto para as larvas, as densidades se mantiveram inferiores a 1 larva/10m³ durante todo este período.

Dentre as larvas e juvenis analisados, cerca de 51% dos indivíduos apresentaram alterações morfológicas incomuns, como: (i) rompimento da cavidade abdominal; (ii) sedimento avermelhado aderido em alguma região do corpo; (iii) sedimento avermelhado em cavidades internas como boca e intestino. Tais alterações foram registradas exclusivamente nos pontos de amostragem da calha do Rio Doce (área afetada pelo rompimento). Todas as larvas registradas nos tributários (área não afetada) apresentavam condições de integridade normal. As concentrações de larvas com alterações na integridade e morfologia ocorreram em maiores densidades totais nas regiões de Colatina.

Observa-se que em termos de riqueza, houve um maior número de táxons de espécies nativas, com

destaque para *M. lineatus*, *P. adspersus*, *Engraulidae* e *H. unifasciatus*. Entretanto, em termos de abundância o destaque é para as espécies introduzidas, principalmente *P. maculatus* e *P. nattereri*. Anostomidae e *Prochilodus* spp. Reconhecendo a proposta da International Union for the Conservation of Nature, que define os riscos dos ecossistemas com base nas ameaças à biota nativa característica dos ecossistemas, é necessária a continuidade do monitoramento para verificar a proporção reprodutiva (desova e recrutamento) das espécies nativas e exóticas na bacia e acompanhar as tendências ao longo do tempo e das localidades de amostragem.

Em consonância com síntese dos resultados supracitados, os peixes podem usar diferentes estímulos e ambientes para a desova (Humphries et al., 1999). A variabilidade de habitats reprodutivos portanto, depende das características regionais da bacia durante a época da reprodução (Humphries et al. 1999). O principal estímulo reprodutivo para peixes neotropicais é o fluxo, isso ocorre, pois, muitas espécies migram para regiões a montante quando o nível dos rios sobe liberam seus ovos fertilizados nos segmentos mais altos da bacia e, ao atingirem o estágio larval, derivam para as depressões marginais (Espínola et al., 2014; Gomes & Agostinho, 1997; Nakatani, Baumgartner, & Cavicchioli, 1997; Vazzoler, 1966).

Assim, a hidrologia é um fator chave para entender as variações interanuais nas assembleias de larvas (Cheshire, Ye, Gillanders, & King, 2015), especialmente para as espécies especialistas dependentes de fluxo (Baumgartner et al., 2014; Cheshire et al., 2015). O sucesso reprodutivo de muitas espécies geralmente está relacionado ao regime de fluxo, que tem sido apontado como um dos principais fatores que afetam a desova e o recrutamento de peixes em grandes rios (Agostinho et al., 2004; Humphries et al. 1999; Junk, Bayley, & Sparks, 1989; King, Humphries e Lake, 2003). Desta forma, os padrões reprodutivos observados até o presente momento do PMBA precisam ser acompanhados ao longo de diferentes ciclos hidrológicos, observando-se as tendências e variações interanuais em detrimentos das diferentes condições hidrológicas de cada ciclo.

Espera-se, portanto, com esta nova etapa do PMBA, monitorar os padrões e modificações na distribuição espacial e temporal das atividades reprodutivas de desova das espécies de peixes ao longo dos ambientes afetados (estações de amostragem na calha do rio Doce) e ambientes controle (estações de amostragem nos principais afluentes). Verificar a relação das densidades de larvas de espécies nativas e exóticas, como um indicador para avaliar quais as espécies ou taxons reproduzem em cada ambiente, e acompanhar as mudanças que eventualmente podem ocorrer no tempo e espaço. Avaliar a presença e a densidade comparativa entre as estações de amostragem, de larvas e juvenis que eventualmente apresentam alterações morfológicas incomuns, com o intuito de verificar o efeito do rejeito no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos peixes nas fases iniciais de vida.

O conjunto resultados da reprodução dos peixes, analisados ao longo de diferentes condições hidrológicas de cada ciclo sazonal entre os anos, auxiliará no estabelecimento de indicadores de distúrbio ou mesmo de tendências de recuperação da biodiversidade aquática do rio Doce ao longo do tempo e espaço.

3. OBJETIVO

Avaliar o processo reprodutivo da ictiofauna regional, por meio do estudo do ictioplâncton, no sistema baixo rio Doce e seus tributários.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

A insuficiência de informações sobre o funcionamento e mecanismos da biota aquática é recorrente nos desastres ambientais. A escassez de informações prévias sobre as características naturais da diversidade aquática, dificulta na notificação dos danos e perdas da biota e na elaboração de medidas de conservação, planos de monitoramento e recuperação do ecossistema e indicadores para atestar a recuperação das características naturais do rio e das comunidades aquáticas.

A desova e o recrutamento são processos fundamentais na história de vida das espécies de peixes. Portanto, a atual etapa do PMBA, além de ter caráter comparativo com os resultados obtidos até o momento, permitirá verificar a evolução dos padrões reprodutivos dos peixes da região sobre diferentes condições hidrológicas. O estabelecimento de indicadores de distúrbio ou recuperação relativo aos processos reprodutivos das espécies de peixes deve considerar a desova, a sazonalidade reprodutiva e o mapeamento das áreas de crescimento das larvas dos peixes, além de explorar, para cada local, a importância de diversas variáveis ambientais que interferem direta ou indiretamente no processo reprodutivo. Garantindo assim, medidas eficientes que visam melhoria da integridade ambiental considerando as perturbações ocorridas sobre a biota aquática.

Este Plano de Trabalho proposto no novo ciclo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática permitirá uma melhor compreensão da distribuição espacial e temporal das desovas de peixes do baixo rio Doce. Desta forma, melhor definir se os locais da calha e os afluentes representam condições favoráveis para as atividades de desova e recrutamento das espécies de peixes nativas.

META 1 - Padrões da ecologia reprodutiva dos peixes

Submeta 1.1.: Inventariar os táxons e guildas reprodutivas que utilizam o sistema durante o período reprodutivo;

Submeta 1.2.: Avaliar a distribuição espacial e temporal dos ovos e das larvas de peixes e os ambientes mais relevantes para a desova;

Submeta 1.3.: Conhecer as áreas utilizadas pelas espécies de peixes durante seu desenvolvimento inicial (criadouros naturais);

Submeta 1.4.: Identificar as rotas utilizadas para migração e reprodução;

Submeta 1.5.: Descrever os gradientes espaciais e temporais das diferentes fases de desenvolvimento dos peixes (ovos, larvas em pré-flexão, larvas em pós-flexão) e inferência sobre os deslocamentos;

META 2 - Tendências de reorganização reprodutiva dos peixes

Submeta 2.1.: Avaliar a importância dos tributários na recolonização da área afetada através da deriva de ovos e larvas de peixes.

Submeta 2.2.: Acompanhar a evolução temporal da reprodução da comunidade de ictiofauna nativa e introduzida (riqueza, abundância, biomassa, diversidade)

Submeta 2.3.: Avaliar a ocorrência, distribuição espacial e proporção de ovos, larvas e juvenis que apresentem alterações morfológicas incomuns.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
- Densidade dos ovos de peixes (ovos/10m³) das estações de amostragem. - Densidade dos ovos de peixes (ovos/10m³) das campanhas, mês e ciclo hidrológico de amostragem. - Densidade de larvas de peixes (larvas/10m³) entre as estações de amostragem. - Densidade de larvas de peixes (larvas/10m³) das campanhas, meses e ciclos hidrológicos de amostragem. - Densidade de larvas de cada taxon por 10 m³ (relação exóticas e nativas). - Caracterização das alterações morfológicas incomuns em larvas, seguindo as seguintes classificações: (i) rompimento da cavidade abdominal; (ii) sedimento avermelhado aderido em alguma região do corpo; (iii) sedimento avermelhado em cavidades internas como boca e intestino. - Densidade de larvas e juvenis com alterações morfológicas/ classificação da alteração por 10 m³.	Jorge Dergam UFV
5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)

• Distribuição espacial, análise comparativa do número e densidade dos ovos de peixes entre as estações de amostragem. Para isso, são realizados testes de variância de um fator e testes a posteriori para duas amostras independentes. A escolha específica do teste depende do padrão de normalidade dos dados que é verificada a cada análise. • Distribuição temporal, análise comparativa do número e densidade dos ovos de peixes entre as campanhas de amostragem, meses e ciclos hidrológicos. Para isso, são realizados testes de variância de um fator e testes a posteriori para duas amostras independentes. A escolha específica do teste depende do padrão de normalidade dos dados que é verificada a cada análise • Distribuição espacial, análise comparativa do número e densidade de larvas de peixes entre as estações de amostragem. Para isso, são realizados testes de variância de um fator e testes a posteriori para duas amostras independentes. A escolha específica do teste depende do padrão de normalidade dos dados que é verificada a cada análise. • Distribuição temporal, análise comparativa do número e densidade de larvas de peixes em deriva entre as campanhas de amostragem, meses e ciclos hidrológicos. Para isso, são realizados testes de variância de um fator e testes a <i>posteriori</i> para duas amostras independentes. A escolha específica do teste depende do padrão de normalidade dos dados que é verificada a cada análise. • Estimativa de densidade de larvas de determinado taxon por 10 m³ através da fórmula: $\text{taxon} / 10\text{m}^3 = \text{número de larvas} / \text{volume de água filtrada} \times 10$. Posteriormente é realizado testes de variância e análises de ordenação. • Estimativa de densidade de larvas e juvenis com alterações morfológicas/classificação da alteração por 10 m³ através da fórmula: $\text{larva ou juvenil-classificação (ex: rompimento da cavidade abidominal)} / 10\text{m}^3 = \text{número de larvas} / \text{volume de água filtrada} \times 10$. Posteriormente é realizado testes de variância e análises de ordenação entre as estações afetadas e controle.	Jorge Dergam UFV

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

Esta proposta de trabalho tem como objetivo aprimorar o grau de comparação entre os pontos afetados e não afetados pelo rejeito nos ambientes lóticos. Assim, propõe-se a adição de dois pontos, por um localizado no rio Manhuaçu e outro no reservatório de Aimorés. A adição do ponto no rio Manhuaçu, ambiente mais semelhante ao Rio Doce, supre essa carência de locais não afetados no monitoramento da ictiofauna e adicionará uma importante contribuição para o entendimento dos processos ecológicos que estão ocorrendo na região do monitoramento. Além disso, a adição do ponto no reservatório de Aimorés possibilitará compreender melhor a influência da fragmentação hidrográfica provocada pelos barramentos na comunidade de peixes, bem como o efeito de filtro de barragem na deriva natural dos

ovos e larvas. A adição de no mínimo três pontos (transectos) de coleta de jovens e larvas ao longo da calha do rio Doce se dá para se verificar um outro aspecto da reprodução dos peixes ainda não abordado, que é a sobrevivência e o recrutamento. Uma vez que o baixo rio doce é caracterizado pela ausência de lagoas marginais e planícies de inundação (tradicionais berçários de peixes) e a presença de grandes lagos com sistemas de drenagem próprios, possivelmente o desenvolvimento dos peixes se dá em microhabitats ao longo da calha do rio.

O estudo, portanto, será conduzido na região do baixo rio Doce, desde sua foz até o limite estadual do Espírito Santo. Neste trecho do rio, serão distribuídos 13 pontos de amostragem para a avaliação de desova de peixes. Para a avaliação do recrutamento de peixes nas fases iniciais de vida, também serão selecionados três pontos com transectos ao longo do rio Doce de no mínimo 8 km de extensão cada. O primeiro transecto localizado na região de transição do reservatório da UHE Mascarenhas, o segundo na região a jusante da barragem da UHE Mascarenhas entre os municípios de Colatina e Linhares e o terceiro próximo a foz. Para a seleção dos transectos, deverá ser traçado o perfil de elevação do rio Doce entre a barragem da UHE Mascarenhas e a sua foz escolhendo os trechos mais planos, cuja velocidade do fluxo tende a ser menor. O objetivo é abranger diferentes tipos de ambientes ao longo do rio, sendo eles: tributários, montante e jusante da barragem UHE Mascarenhas, calha do rio Doce e microambientes semi-lênticos ao longo da calha do rio Doce que atuam como zonas de retenção.

Figura 9: Mapa com localização das estações de monitoramento propostas para atendimento do PMBA, Ambiente Dulcícola, tema Ictioplâncton Dulcícola.

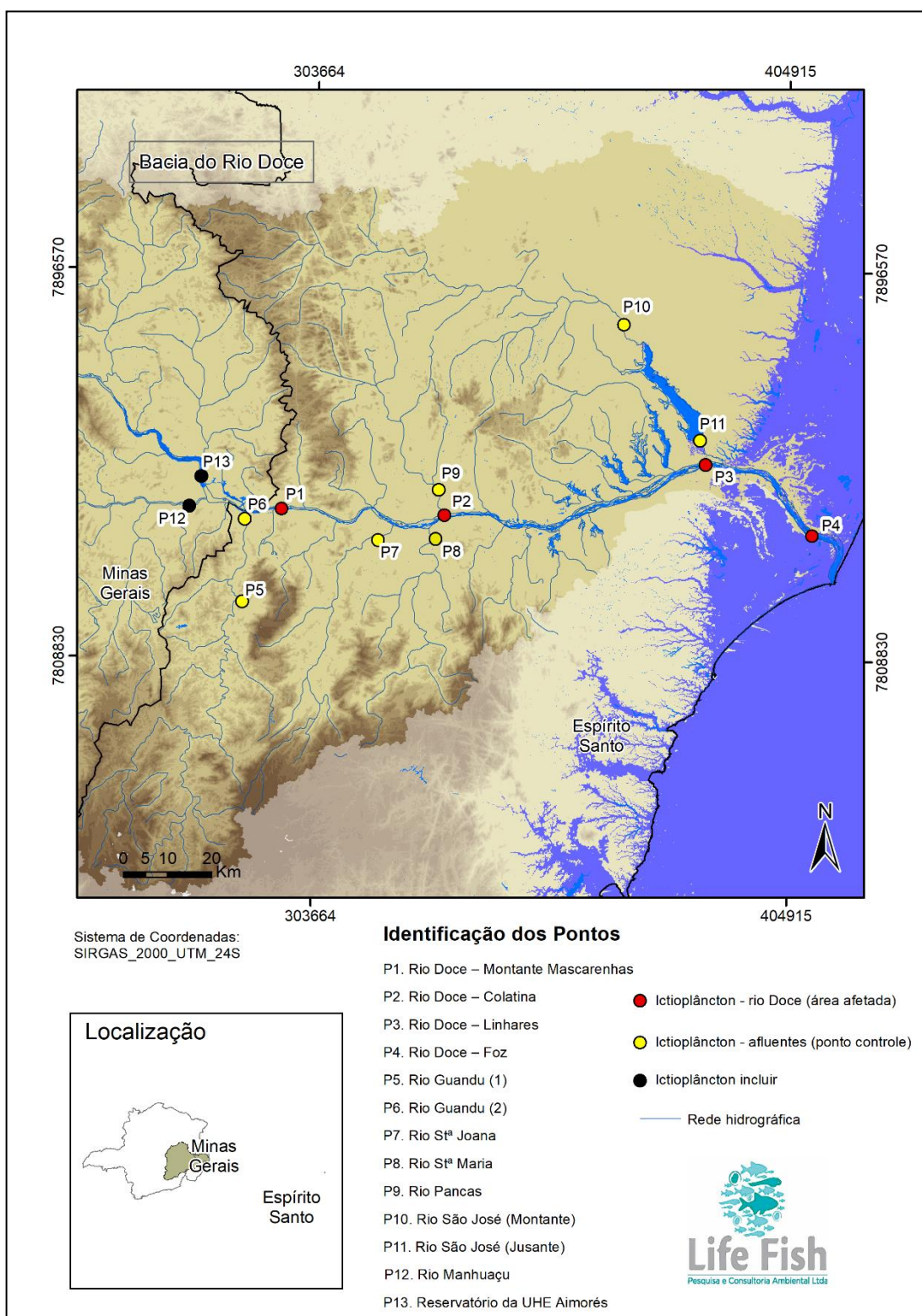


Tabela 5: Comparação entre as malhas amostrais atuais do PMBA e a nova proposta para o Ambiente Dulcícola, tema Ictioplâncton Dulcícola.

Código	Ambiente/Município	Situação	X (UTM)	Y (UTM)
P1	Calha Rio Doce – Montante do reservatório UHE Mascarenhas/Baixo Guandu-ES	Permanece	288580	7841914
P2	Calha Rio Doce/Colatina ES	Permanece	328712	7839539
P3	Calha Rio Doce/Linhares-ES	Permanece	388146	7853577
P4	Calha Rio Doce/Foz- Regência-ES	Permanece	414615	7829621
P5	Rio Guandu/ Trecho alto	Permanece	288426	7821775
P6	Rio Guandu/ Trecho baixo	Permanece	288652	7840616
P7	Rio Santa Joana	Permanece	316000	7836299
P8	Rio Santa Maria	Permanece	315430	7836148
P9	Rio Pancas	Permanece	330094	7847179
P10	Rio São José Montante do lago Juparanã	Permanece	369465	7884757
P11	Rio São José Jusante do lago Juparanã	Permanece	387586	7854284
P12*	Rio Manhuaçu/Aimorés-MG	Incluir	276153	7843540
P13*	Calha Rio Doce – Reservatório UHE Aimorés/Aimorés-MG	Incluir	279082	7849382

* Coordenadas UTM dos pontos 12 e 13 poderão sofrer alteração para possibilitar melhor acesso. Para a análise de recrutamento serão adicionados três transectos de 8km cada nos trechos do rio Doce de menor elevação..

6.2. METAS 1 e 2 - Amostragens

As amostragens serão realizadas em cada ponto ao anoitecer (18:00-20:00) e amanhecer (6:00-8:00) com duração aproximada de 10 minutos ou menos, caso a carga de sedimento seja alta na ocasião. **A frequência amostral será quinzenal durante o período de chuvas entre novembro e março de cada período reprodutivo e mensal entre abril e setembro de cada ano de amostragem. As amostragens serão realizadas durante 18 meses consecutivos.**

Nos pontos localizados nos ambientes lóticos, calha do rio Doce e afluentes serão utilizadas redes de plâncton do tipo cônico-cilíndricas de malhagem 0,5 mm, e área de boca estimada em 0,06605 m², as quais serão posicionadas contra a correnteza. Nos pontos cuja seção transversal do rio é mais extensa (especificamente na calha do rio Doce) sempre que possível, as coletas devem ser feitas de maneira a posicionar três redes de superfície (margens esquerda, direita e centro do rio-talvegue) e uma de fundo (centro), desde que os locais de amostragem tenham ao menos 1,5 metros de profundidade. Nos pontos de tributários, cujo canal é mais estreito, a coleta deve ser realizada somente no centro.

Nos ambientes lênticos e semi-lênticos (RMAS, transectos na calha do rio Doce), as redes serão arrastadas com o barco a baixa velocidade na superfície. Todas as redes serão equipadas com fluxômetro para a obtenção do volume de água filtrada. Devido ao fato destes organismos diferirem em tamanho, distribuição horizontal, comportamento, disponibilidade temporal e suscetibilidade aos vários aparelhos de captura, quando as condições locais permitirem será utilizado um peneirão para amostrar

a fauna associada à vegetação aquática litorânea, e também um picaré para amostragens em áreas de praias (Nakatani et al., 2001). Ambas as coletas, contribuirão para o levantamento de áreas utilizadas para o crescimento e recrutamento da ictiofauna e complemento do inventário ictiofaunístico da região.

Em todas as amostras obtidas será adicionado previamente eugenol (4-Alil-2-Metoxifenol; 0,00005 ml/l) (conforme Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA; Brasil, 2015), como método de eutanásia. Em sequência, estas amostras serão fixadas com formol diluído a 4%, tamponado com carbonato de cálcio e encaminhadas para posterior análise.

Em cada ponto de amostragem e campanha também será coletada uma amostra que será fixada em álcool absoluto, preservada sob refrigeração e, posteriormente, destinada para análise e identificação molecular.

6.3. METAS 1 e 2 -Laboratório

As amostras de ictioplâncton serão triadas com auxílio de um estereomicroscópio, utilizando-se placa do tipo Bogorov para separar e quantificar os ovos e as larvas e, quando presentes, os juvenis e os adultos capturados.

Para a identificação das larvas será utilizada a técnica de sequência regressiva de desenvolvimento, a qual utiliza a forma do corpo, presença de barbilhões, sequência de formação das nadadeiras, posição relativa da abertura anal em relação ao corpo, número de vértebras/miômeros e raios das nadadeiras (Ahlstrom & Moser, 1976; Nakatani et al., 2001), além de literatura especializada (Nakatani et al., 2001; Garcia et al., 2016). Os juvenis e adultos serão identificados de acordo com bibliografia científica disponível para as espécies de peixes da região.

Após a identificação, ovos e larvas serão enquadrados em estágios de desenvolvimento de acordo com Ahlstrom et al. (1976) modificado por Nakatani et al. (2001). Ovos: - Clivagem inicial (CI), estágio onde ocorre a formação das primeiras células; Embrião inicial (EI), estágio em que se inicia a formação do embrião; Embrião com cauda livre (CL), estágio onde a cauda se separa do vitelo; e Embrião final (EF), estágio onde o embrião encontra-se completamente formado e pronto para a eclosão. As larvas serão enquadradas em: Larval vitelino (LV) - estágio de desenvolvimento compreendido entre a eclosão e a primeira alimentação exógena (olho parcial ou completamente pigmentado e abertura da boca e ânus); Pré-flexão (PF) – estágio de desenvolvimento que se estende desde o início da alimentação exógena até o aparecimento dos elementos de suporte da nadadeira caudal; Flexão (FL) – estágio de desenvolvimento que se caracteriza pelo aparecimento dos elementos de suporte da nadadeira caudal até a completa flexão da notocorda, aparecimento do botão da nadadeira pélvica e o início de segmentação dos raios das nadadeiras dorsal e anal; e Pós-flexão (FP) – estágio que se caracteriza pela completa flexão da notocorda, aparecimento do botão da nadadeira pélvica e o início de segmentação dos raios das nadadeiras dorsal e anal até a completa formação dos raios da nadadeira peitoral, absorção da nadadeira embrionária e o aparecimento de escamas.

Amostras preservadas em álcool também serão triadas e o material biológico será separado, preservado em etanol absoluto e armazenados em freezer para posterior análise molecular. A identificação individual dos ovos e larvas será realizada utilizando a técnica de sequenciamento de DNA pelo método Sanger, de acordo com Becker et al. (2015) e/ou de agrupamento de amostras utilizando a técnica de identificação metagenômica, com o uso de primers específicos para peixes com marcadores 12S (Thomsen et al., 2016).

Os registros fotográficos relacionados a esta avaliação devem ser feitos com câmera de boa qualidade de resolução acoplada a um microscópio estereoscópio.

6.4. METAS 1 e 2 - Análise de dados

Os padrões de distribuição de ovos e larvas e sua correspondência com as variáveis ambientais coletadas deverão ser analisadas por meio de comparação descritiva (gráficos), e de técnicas de análise uni e multivariada.

6.5. METAS 1 e 2 - Destino das amostras

Os organismos coletados deverão ser obrigatoriamente depositados em coleções de referência, preferencialmente localizadas nos Estados de Minas Gerais ou Espírito Santo, acompanhado de dados de localidade de coleta (com latitude e longitude), data da coleta, nome do coletor, método de coleta e outras observações disponíveis. A instituição coletora deverá apresentar carta de aceite e recebimento da instituição recebedora. Exemplares também serão depositados na Coleção Ictiológica do Nupélia-UEM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A., GOMES, L. C., VERÍSSIMO, S., & OKADA, E. K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: Effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 2004.
- AHLSTROM, E. H., & MOSER, H. G. Eggs and larvae of fishes and their role in systematic investigations and in fisheries. **Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes**, 40(3), 379–398, 1976.
- BAUMGARTNER, L. J., CONALLIN, J., WOODEN, I., CAMPBELL, B., GEE, R., ROBINSON, W. A., & MALLIN-COOPER, M. Using flow guilds of freshwater fish in an adaptive management framework to simplify environmental flow delivery for semi-arid riverine systems. **Fish and Fisheries**, 15(3), 410–427, 2014.
- BECKER, R. A., SALES, N. G., SANTOS, G. M., SANTOS, G. B., & CARVALHO, D. C. DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco. **Journal of Fish Biology**, 87(1), 159-168, 2015.

CHESHIRE, K. J. M., YE, Q., GILLANDERS, B. M., & KING, A. Annual variation in larval fish assemblages in a heavily regulated river during differing hydrological conditions. **River Research and Applications**, 32(6), 1207–1219, 2015.

ESPÍNOLA, L. A., AMSLER, M. L., PAIRA, A. R., DRAGO, E. C., BLETTLER, M. C. M., & AGOSTINHO, A. A. Effects of decadal changes in the hydrological regime of the middle reach of the Paraná River (Argentina) on fish densities. **Environmental Biology of Fishes**, 97(7), 757–771, 2014.

GOMES, L. C., & AGOSTINHO, A. A. Influence of the flooding regime on the nutritional state and juvenile recruitment of the curimba, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, in upper Paraná River, Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, 4(4), 263–274, 1997.

HUMPHRIES, P., KING, A. J., & KOEHN, J. D. Fish, flows and flood plains: Links between freshwater fishes and their environment in the Murray- Darling River system, Australia. *Environmental Biology of Fishes*, 56(1–2), 129–151, 1999.

JUNK, W. J., BAYLEY, P. B., & SPARKS, R. E. The flood pulse concept in river-floodplain systems. **Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences**, 106, 110–127, 1989..

KING, A. J., HUMPHRIES, P., & LAKE, P. S. Fish recruitment on floodplains: The roles of patterns of flooding and life history characteristics. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 60(7), 773–786, 2003.

MA, Q., LI, M., QIN, X., LIU, H., & CAO, W. Ichthyoplankton recruitment from mainstream of the Changjiang River into the Dongting Lake, the second largest freshwater lake in China. **Journal of Oceanology and Limnology**, 37(3), 1090–1101, 2019.

NAKATANI, K., AGOSTINHO, A. A., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P. V., MAKRAKIS, M. C., & PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá, PR: Eduem, 2001

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G., & CAVICCHIOLI, M. **Ecologia de ovos e larvas de peixes**. In A. E. A. M. Vazzoler, A. A. Agostinho, & N. S. Hahn (Eds.), *A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos* (pp. 381–306). Maringá, PR: Eduem, 1997.

THOMSEN, P. F. ET AL. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. **PloS One**, 2012.

Vazzoler, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, PR: Eduem. 1966.

MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dr. Jorge Abdala Dergam	Coordenador	UFV
Dr. Wander Ribeiro Ferreira	Pesquisador/Pós-Doc Senior, subcoordenador responsável pela coleta de amostras, processamento em laboratório, identificação de organismos bentônicos, gerenciamento de planilhas de dados, análise de dados, elaboração de mapas e relatórios técnicos.	UFV
A contratar	Iniciação científica responsável pela lavagem, triagem e identificação de macroinvertebrados bentônicos, tabulação de dados e elaboração de relatórios técnicos	UFV

2. ESCOPO

Este plano de trabalho visa a continuidade do monitoramento sazonal das comunidades de macroinvertebrados bentônicos, avaliação do status ecológico dos trechos de rios na porção baixa da bacia do Rio Doce com auxílio de protocolos de qualidade de habitats, avaliação da qualidade de água na perspectiva de macroinvertebrados bentônicos bioindicadores de qualidade de água e deformidades em mento de quironomídeos coletores-catadores.

O conjunto de dados abióticos levantados durante 2 anos de monitoramento do PMBA e até o momento e uso de ferramentas ecológicas (protocolos e índices bióticos bentônicos) somados à avaliação da biota aquática permitiram apontar tendências robustas e um retrato geral dos níveis de degradação nos diferentes trechos amostrados na calha do rio, tributários e ambientes lênticos (lagos do Baixo Rio Doce).

Os resultados do uso de ferramentas ecológicas (protocolo de habitats e índice biótico bentônico) e o status da biota aquática ainda continua apontando para ambientes pobres e com muita pressão antrópica. No entanto, comparando as avaliações ao longo do monitoramento, foi possível observar a evolução e melhora entre os períodos chuvoso e seco.

Em relação à avaliação das condições ecológicas de habitats físicos dos ambientes lóticos amostrados no Baixo Rio Doce foi utilizado o protocolo proposto por Callisto et al. (2002). Os resultados obtidos praticamente não variaram em termos de classificação dos ambientes em impactado (P01B e P02), alterado (P03, P04, P07 e P08B) e natural (P09) nos períodos chuvoso e seco.

No geral os dados do protocolo sugerem que foram informativos para relacionar integridade de habitats e as assembleias de macroinvertebrados bentônicos e foi possível observar uma tendência de melhora nas condições ecológicas em direção à foz do rio.

Em relação a qualidade de água, a aplicação do índice multimétricos bentônico (IMB) evidenciou que no período chuvoso os principais problemas de qualidade de água estavam associados aos pontos classificados como impactados como por exemplo na calha do rio, P01B em Baixo Guandu e P02 em Marilândia no Espírito Santo. No período seco houve uma mudança na qualidade das águas exceto para o ponto P01B que permaneceu com o status de qualidade de água ruim. Os demais pontos classificados como qualidade de água regular no período chuvoso passaram para a condição de água de boa qualidade no período seco e os pontos que foram classificados como qualidade boa passaram para a condição de qualidade de água muito boa, como é o caso do ponto P04 na calha do rio e o ponto P09 córrego São Pedro Frio.

Em relação a estrutura e composição das assembleias de macroinvertebrados bentônicos, a riqueza de macroinvertebrados coletados nos pontos amostrais dos trechos lóticos apresentou um aumento considerável no período seco em relação ao período chuvoso. Em ambos os períodos sazonais, nos pontos amostrais, foi constatada uma predominância de larvas Diptera da família Chironomidae principalmente de larvas coletoras-catadoras que se alimentam basicamente de matéria orgânica particulada fina depositadas no sedimento. Outro grupo predominante foi as minhocas d'água (Oligochaeta) no período chuvoso que é um dos principais táxons tolerantes e resistentes à degradação de ambientes e moluscos Gastropoda no período seco. A predominância destes organismos é evidente em ambientes assoreados, com predominância de sedimentos finos e elevadas concentrações de matéria orgânica (FERREIRA et al., 2011). Assim, a predominância de larvas da família Chironomidae, Oligochaeta e Gastropodas são indicativos de um desequilíbrio ambiental ocasionados pela pressão antrópica, perda de habitats físicos e baixa qualidade físico-química das águas do Baixo Rio Doce.

Em relação aos estimadores riqueza (Chao, Jackknife, Bootstrap, ACE e ICE) no geral as curvas de acumulação de espécies não apresentaram estabilidade nem para a riqueza observada e nem para a riqueza estimada tanto para os ambientes lóticos quanto para os lênticos em ambos períodos chuvoso e seco. Os resultados sugerem a importância de se considerar o esforço amostral nas próximas etapas do monitoramento.

Em relação aos estudos das variações espaço-temporais da diversidade beta (perdas e ganhos de espécies), os maiores valores de diversidade beta foram encontrados no período seco e implica que no período chuvoso os distúrbios naturais como aumento do fluxo em trechos lóticos em função de chuvas resultam na diminuição da diversidade beta. Até o momento, o estudo da diversidade beta foi importante para determinar que no período seco é o período mais importante para se concentrar

esforços em estudos de ecologia de comunidades bentônicas e fatores de influência, como por exemplo influência antrópica. Legendre (2019) destaca a importância de se estudar a diversidade beta (perdas e ganhos de espécies) como método útil para identificar locais excepcionais em pesquisas espaço-temporais para estudar os impactos antrópicos, incluindo as mudanças climáticas.

A avaliação de deformidades no mento (aparelho bucal) das larvas dos gêneros da família Chironomidae, especificamente as larvas classificadas quanto ao grupo trófico funcional coletor-catador, os resultados sugerem influência de metais em alguns pontos amostrais P03 (calha do Rio Doce), P06 (Lago do Óleo), P07 (ribeirão Palmas) e P09 (córrego São Pedro Frio) no período chuvoso e os pontos P02 e P08B (ambos na calha do Rio Doce) no período seco. Nestes pontos a incidência e a predominância de deformidade foi de grau fraco a severo (CALLISTO et al., 2000) e a incidência de deformidades encontradas foram acima de 8%. Segundo Deliberalli et al. (2018) alguns estudos indicam que até 8% de incidência de deformidade é normal em ambientes minimamente impactados por metais. Trata-se de um desgaste natural em consequência dos hábitos alimentares das larvas. Nos pontos amostrais do PMBA/Fest-RRDM no período seco a incidência de deformidades severa foi maior, o que nos leva a acreditar que neste período a concentração de metais pesados em alguns trechos do Rio Doce e Lagos foram maiores. Vale ressaltar que a densidade de larvas coletoras-catadoras em alguns pontos, por exemplo o ponto P06 Lago do Óleo apesar do percentual de deformidades ter sido alto, o número de indivíduos coletores-catadores coletados foi baixo. Atenção especial deve ser direcionada para as condições dos habitats dos trechos lóticos da Bacia do Rio Doce que tiveram uma avaliação ruim e estão influenciando de forma negativa a estrutura e composição da macrofauna bentônica, bem como sua distribuição devido à falta de habitats diversificados importantes para o estabelecimento e fixação dos organismos.

A continuidade do monitoramento será fundamental para acompanhar a evolução da qualidade ambiental da bacia e para minimizar as lacunas referentes a estrutura e composição das comunidades de macroinvertebrados bentônicos e suas relações com fatores ambientais e subsidiar informações de fundamental importância para projetos de conservação e recuperação na porção Baixa do Rio Doce no Estado do Espírito Santo. A malha amostral foi redefinida, para adequar o máximo possível, os pontos de coleta e a frequência das equipes da área biótica do PMBA.

3. OBJETIVO

Em um monitoramento temporal avaliar os efeitos de impactos antrópicos, estado ecológico ambiental considerando a qualidade das águas e integridade de habitats físicos, na estrutura e distribuição de comunidades de macroinvertebrados bentônicos e também avaliar a presença de deformidades no mento (aparato bucal) de larvas de insetos da família Chironomidae afetadas por potenciais contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes na água de origem antrópica.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 - Estudo de comunidade

Monitoramento das assembleias de macroinvertebrados bentônicos quanto a riqueza e distribuição e diagnóstico de qualidade ambiental dentro da perspectiva de espécies encontradas serem utilizadas como bioindicadoras da qualidade ambiental considerando as variações ambientais nos ecossistemas aquáticos alvos proposto neste estudo.

META 2 - Uso de índices bióticos e protocolos de avaliação de habitats

Aplicação de ferramentas ecológicas como índices bióticos e protocolos de avaliação de habitats (Callisto et al. 2002) na busca de um retrato ou padrões das condições ecológicas dos trechos amostrais, bem como avaliar seus efeitos na estrutura e composição de comunidades de macroinvertebrados ao longo dos trechos amostrais estudados.

META 3 - Estudo de deformidades estruturais em macroinvertebrados bentônicos

Avaliar possíveis deformidades estruturais no aparelho bucal de larvas de insetos aquáticos dulcícolas da família Chironomidae na busca de inferir sobre a presença de poluição orgânica e inorgânica como possíveis contaminantes oriundos de metais pesados nos trechos amostrais proposto neste estudo.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- Levantamento da bentofauna dos trechos amostrados em tributários e calha da bacia do Rio Doce no âmbito do PMBA; - Caracterização da estrutura de comunidades bentônicas através dos índices de riqueza, dominância, equitabilidade, similaridade e diversidade; - Composição e caracterização de comunidade em cada ponto amostral incluindo a nova estação amostral (Rio Guandu); - Caracterização de grupos de alimentação funcional predominantes nos trechos amostrais; - Determinação do percentual de deformidades no aparelho bucal de larvas da família Chironomidae como forma de inferir sobre a presença de possíveis metais pesados e outros contaminantes; - Avaliação das condições ecológicas de cada ponto amostrado através do Índice de Integridade de habitat e relações dos organismos com o mesmo.	Jorge Dergam e UFV

- Relação entre espécies/habitat através de índices bióticos bentônicos e protocolos de habitats.

5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Descrição das comunidades: 1) Abundância relativa das espécies; 2) Curvas de rarefação e/ou acumulação de espécies 2) Índices de Diversidades (riqueza, Shannon-Wiener) 3) Equitabilidade; 4) Espécies indicadoras; 5) Coeficientes de similaridade/dissimilaridade entre os pontos de amostragem; 6) Análises multivariadas para comparações espaciais / temporais considerando à influência das características ambientais/fisiográficas e geográficas dos pontos sobre a distribuição das comunidades bentônicas. 7) Classificação dos grupos de alimentação funcional e análises multivariadas para comparar estes grupos entre os pontos amostrais. 8) Ordenação visual do tipo MDS (<i>Metrical Multidimensional Scaling</i>) seguido da análise de similaridade ANOSIM para verificar as diferenças na composição de macroinvertebrados bentônicos nos diferentes ecossistemas e campanhas amostrais.	Jorge Dergam

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

Os estudos da estrutura e composição das comunidades de macroinvertebrados bentônicos serão realizados em 11 pontos amostrais (mesmos pontos de amostragens da ictiofauna) com frequência amostral trimestral nas estações sazonais chuvosa e seca. Os pontos estão localizados na porção baixa da bacia do Rio Doce no Estado do Espírito Santo e compreendem seis ambientes lóticos, três ambientes lênticos (lagos) e 2 ambientes semi-lênticos (Reservatório UHE Aimorés e UHE Mascarenhas) (Figura 10 e Tabela 6).

Esta proposta de trabalho tem como objetivo aprimorar o grau de comparação entre os pontos afetados e não afetados pelo rejeito nos ambientes lóticos. Ajustes na malha amostral foram implementados com o objetivo de adequação das metodologias aplicadas no PMBA e desta forma foi excluído o ponto P09 (córrego São Pedro Frio) e incluído 2 pontos amostrais: um na calha do Rio Doce em Aimorés (P11. Reservatório UHE Aimorés) e outro no rio Manhuaçu (P12*).

Adequação da metodologia de caracterização dos habitats nos trechos de amostragens com a aplicação do protocolo de caracterização de habitats de acordo com Callisto et al. (2002) e que embora foi desenvolvido para riachos de cabeceira foi aplicado em tributários do Rio Doce.

Espera-se com os ajustes e adequação das metodologias e pontos amostrais um melhor retrato das relações da biota aquática da bacia do Rio Doce com seus impactos e a busca de padrões que explicam a estrutura, composição e distribuição de comunidades aquáticas ao longo dos trechos amostrados no âmbito do PMBA.

Figura 10: Mapa com localização das estações de monitoramento propostas para atendimento do PMBA, Ambiente Dulcícola, tema Ictiofauna Dulcícola.

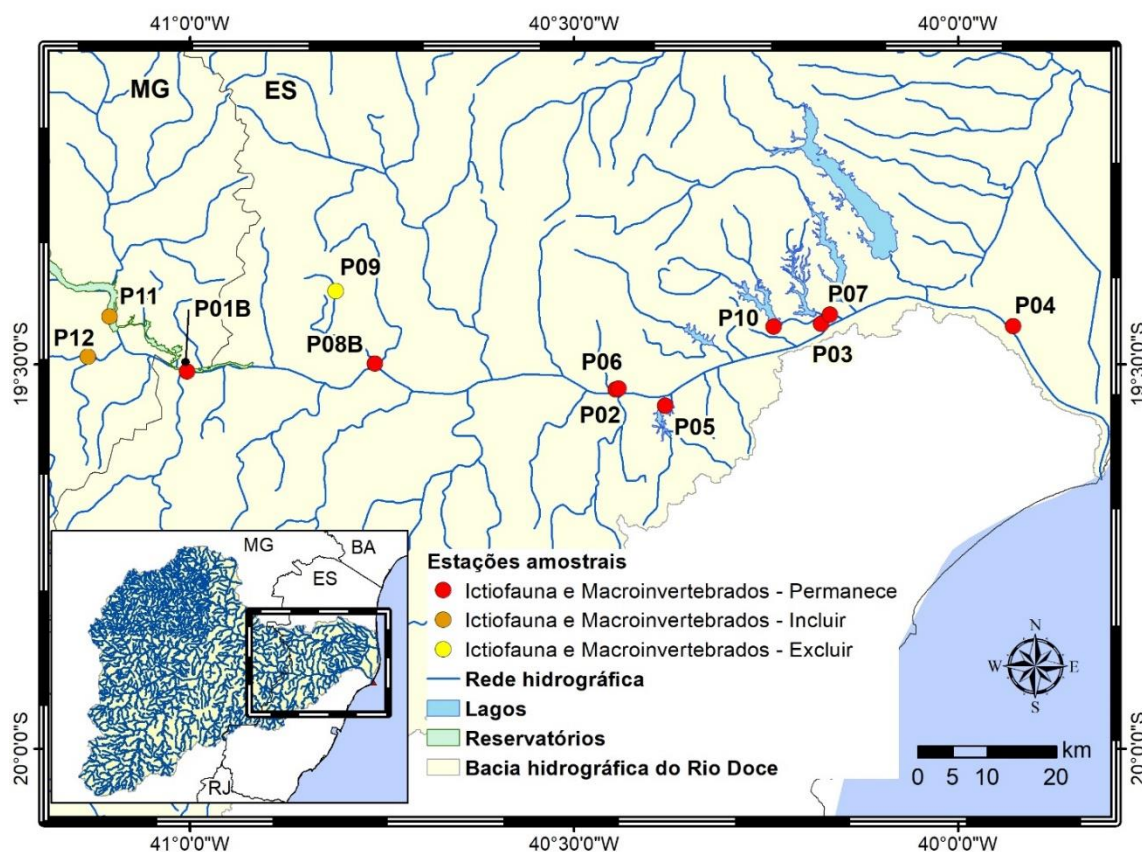


Tabela 6: Comparação entre as malhas amostrais atuais do PMBA e a nova proposta para o Ambiente Dulcícola, tema Ictiofauna Dulcícola.

Código	Ambiente/Município	Situação	X (UTM)	Y (UTM)
P01B	Calha Rio Doce – Reservatório UHE Mascarenhas/Baixo Guandu-ES	Permaneça	289743	7841597
P02	Calha Rio Doce/Marilândia-ES	Permaneça	348378	7839577
P03	Calha Rio Doce/Linhares-ES	Permaneça	376384	7849263
P04	Calha Rio Doce/Linhares-ES	Permaneça	402605	7849080
P05	Lago do Limão/Colatina-ES	Permaneça	355148	7837322
P06	Lago do Óleo/Marilândia-ES	Permaneça	348731	7839743
P07	Córrego Ribeirão das Palmas/Linhares-ES	Permaneça	377545	7850618

Código	Ambiente/Município	Situação	X (UTM)	Y (UTM)
P08B	Calha Rio Doce/Colatina-ES	Permanece	315430	7842984
P09	Córrego São Pedro Frio/Colatina-ES	Excluída	369855	7848788
P10	Lago das Palmas/Linhares-ES	Permanece	289743	7841597
P11*	Calha Rio Doce – Reservatório UHE Aimorés/Aimorés-MG	Incluir	279082	7849382
P12*	Rio Manhuaçu/Aimorés-MG	Incluir	276153	7843540

* Coordenadas UTM dos pontos 11 e 12 poderão sofrer alteração para possibilitar melhor acesso.

6.2. METAS 1, 2 e 3 - Coleta de macroinvertebrados bentônicos

Durante as campanhas de campo serão coletadas no mínimo três amostras de sedimento em cada um dos pontos amostrais ao longo da bacia (Figura 1 e Tabela 1). O maior número de habitats possíveis será amostrado, utilizando-se um amostrador do tipo rede em D-kick-net (0,09 m² de área amostrada, malha 500 µm) ou outro apetrecho que melhor de a adequa ao tipo de ambiente a ser amostrado (draga de Petersen e Heckman-Birge e coletor tipo Surber) para a avaliação das comunidades de macroinvertebrados bentônicos. As amostras coletadas serão fixadas com solução de formalina a 4% e conduzidas ao laboratório. As amostras serão lavadas sobre peneiras de 0,500 a 0,250 mm de malha, e triadas com auxílio de microscópio estereoscópico, sendo os macroinvertebrados bentônicos identificados ao menor nível taxonômico quando possível utilizando-se de manuais de identificação (Merritt e Cummins 1996; Fernández e Domínguez 2001; Costa et al. 2006; Mugnai et al. 2010; Trivinho-Strixino 2011; Hamada et al. 2014). Os exemplares identificados e etiquetados segundo as recomendações de França e Callisto (2007) serão depositados em Coleção de Macroinvertebrados Bentônicos.

6.3. METAS 1 e 2 - Aplicação de índices multimétricos bentônicos

Com os dados biológicos obtidos na avaliação das comunidades serão calculadas diversas métricas biológicas para compor o índice multimétrico que refletirão aspectos da composição e estrutura de comunidades de macroinvertebrados bentônicos bioindicadores de qualidade de água, bem como sua integridade biótica (Klemm et al., 2003). Por exemplo, a aplicação de índices multimétricos bentônicos avaliam a qualidade dos ambientes de acordo com as pontuações atribuídas métricas bióticas com base nas proporções de organismos sensíveis e tolerantes aos impactos (Tabela 7). Para este projeto as métricas serão selecionadas levando em consideração os aspectos ecológicos das comunidades de macroinvertebrados bentônicos e suas respostas frente aos diferentes impactos nos ecossistemas aquáticos.

Tabela 7: Proposição de métricas biológicas com base na resposta esperada da comunidade de macroinvertebrados bentônicos (se diminuição ou aumento) frente à impactos.

Categorias	Métricas	Respostas esperadas
Riqueza	Nº total de taxa	Diminuição
	Nº taxa de EPT	Diminuição
	Nº taxa de Ephemeroptera	Diminuição
	Nº taxa de Ephemeroptera	Variável
	Nº taxa de Plecoptera	Diminuição
	Nº taxa de Trichoptera	Diminuição
	Nº taxa de Coleoptera	Diminuição
	Nº taxa de Diptera	Aumento
Composição	Nº de Mollusca	Aumento
	% EPT	Diminuição
	Nº de Odonata	Variável
	% Ephemeroptera	Diminuição
	% Plecoptera	Diminuição
	% Trichoptera	Diminuição
	% Coleoptera	Diminuição
	% Diptera	Aumento
	% Chironomidae	Aumento
	% Chironomidae e Oligochaeta	Aumento
	% Mollusca	Aumento
	% Taxa dominante	Aumento
Tolerância	% Três Taxa dominantes	Aumento
	Nº taxa intolerantes	Diminuição
Grupos tróficos	Nº taxa tolerantes	Aumento
	% Raspadores	Diminuição
	% Fragmentadores	Diminuição
	% Coletores-catadores	Aumento
	% Filtradores	Variável
Índices	% Predadores	Variável
	Shannon-Wiener	Diminuição
	BMWP	Diminuição
	Equitabilidade	Diminuição
	ASPT	Aumento

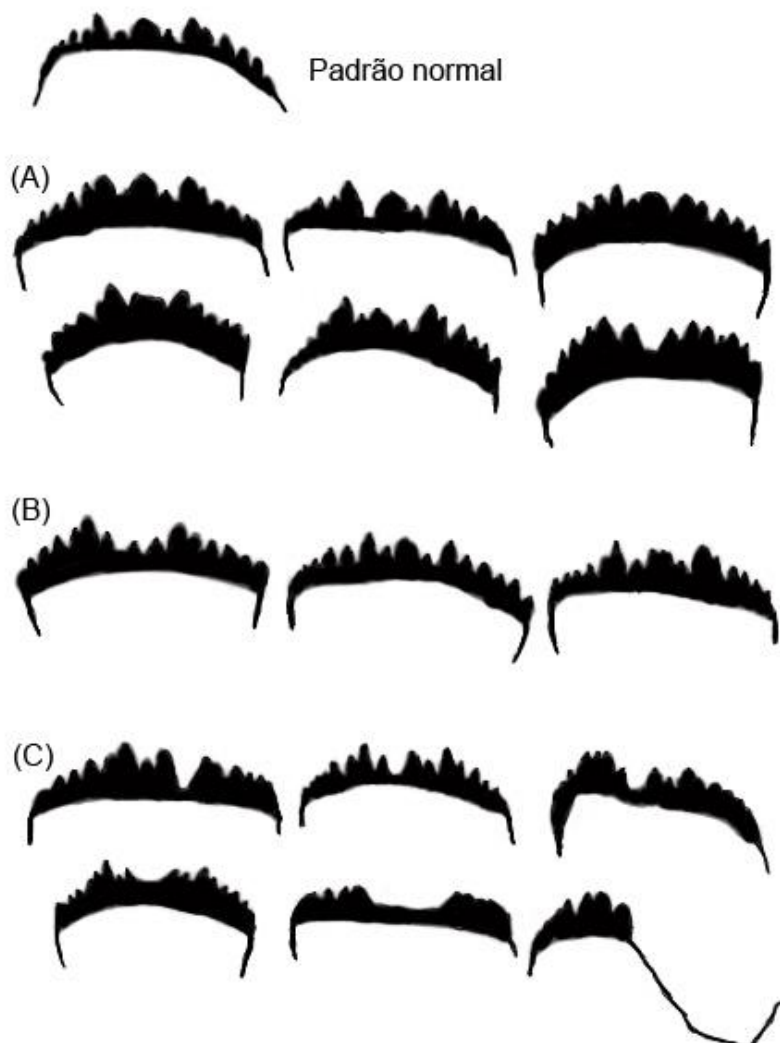
6.4. METAS 1 e 3 - Avaliação de deformidades no mentum de larvas da família Chironomidae

As larvas de Chironomidae coletadas, principalmente do gênero *Chironomus* e outros classificados quanto a sua alimentação funcional coletor-catador, que se alimentam de matéria orgânica depositadas do sedimento, terão suas partes bucais dispostas em lamínulas para serem analisadas em microscópio e avaliar os padrões destas partes.

A metodologia será basicamente a proposta por Callisto et al. (2000) em um estudo na bacia do rio Piracicaba afluente do Rio Doce. Neste estudo Callisto e colaboradores avaliaram 3 classes de deformidades divididos em 15 diferentes variações comparadas ao padrão normal (A - sem dente lateral

externo; B – deformidade medial fraca e C – deformidade medial severa ou qualquer combinação de fortes deformidades, Figura 11).

Figura 11: Classificação de deformidades do mentum de larvas de insetos do gênero *Chironomus*. A - Sem dente lateral externo; B – Deformidade medial fraca e C – Deformidade medial severa ou qualquer combinação de fortes deformidades. Figura adaptada de Callisto et al. (2000).



6.5. METAS 1, 2 e 3 - Análises estatísticas

Para a análise de dados serão utilizadas as ferramentas estatísticas para analisar as relações das comunidades bentônicas com a integridade dos habitats e impactos antrópicos. Serão utilizadas análises de variância (ANOVA, ANOSIM), análises de ordenação (NMDS, PCA, CCA, RDA) e espécies indicadoras (IndVal).

Análises de regressão múltipla poderão ser aplicadas para avaliar quais métricas de habitats físicos e

químicos melhor explicam a riqueza e abundância das comunidades de EPTs e Odonatas.

Análises de variância ANOVA serão realizadas no intuito de se verificar se a condição ecológica dos pontos de amostragens e as estações climáticas (chuva e seca) influenciaram significativamente na composição táxonômica de macroinvertebrados. Os dados serão previamente tratados visando atender os pressupostos de homogeneidade e homocedasticidade das variâncias dos dados.

No intuito de se analisar as diferenças nas composições das assembleias de macroinvertebrados amostradas nos diferentes ecossistemas aquáticos e campanhas amostrais, será realizada uma ordenação do tipo nMDS ("metrical multidimensional scaling"), utilizando o índice de distância de Bray-Curtis. Essa análise apresenta em um plano bidimensional todas as estações amostradas, nas diferentes campanhas amostrais, posicionando-as segundo a similaridade entre elas. Em seguida será realizada uma análise de similaridade (ANOSIM), também utilizando a distância de Bray-Curtis, no sentido de verificar estatisticamente se os grupos observados visualmente pela MDS foram de fato heterogêneos entre si com relação à composição táxonômica. Nesta análise a dissimilaridade média existente entre as amostras de dentro dos grupos é subtraída da dissimilaridade média existente entre as amostras dos diferentes grupos (Valor R). Os valores R variam entre -1 (similaridade total entre os grupos) e 1 (dissimilaridade total entre os grupos). Um valor R igual ou próximo a zero indica uma distribuição aleatória dos táxons entre os grupos, ou seja, que os grupos não possuem identidade com relação à composição táxonômica. Um processo de aleatorização de todas as amostras (teste de Monte Carlo, 10.000 iterações) será realizado para avaliar a validade dos valores de R observados. Um valor $p > 0,05$ (mais que 5% das iterações aleatórias gerando valores iguais ou maiores que o R observado) indica que o valor de R observado poderia ter sido obtido ao acaso.

Estimativa de riqueza táxonômica (curvas de rarefação ou acumulação de espécies) utilizando estimadores Chao 1 e 2, Jackknife 1 e 2, Bootstrap, ACE e ICE serão aplicadas com o intuito de avaliar como a riqueza de macroinvertebrados bentônicos varia de acordo com o esforço amostral. O número de taxa aumenta com o aumento no número de amostras e quando a curva atinge a estabilização, ou seja, quando não se observa aumento da riqueza com o aumento do esforço amostral indicando que todas as espécies foram amostradas. Os estimadores permitem estimar o número esperado de espécie em relação ao observado em um conjunto de amostras. Além disso permite estimar um número mínimo necessário de amostras para a caracterização de uma comunidade em um determinado ecossistema.

Análise de espécies indicadoras (IndVal) será realizada com o intuito de verificar quais taxa serão mais importantes na diferenciação das composições das assembleias de macroinvertebrados das estações de amostragens. Esta análise confere a cada táxon valores de indicação (IV), que variam de 0 a 100, segundo a abundância e a frequência relativa de cada um nos grupos definidos previamente, que nesse caso serão estações amostrais e períodos sazonais de chuvas e seca. Se, para um dado táxon, os valores de indicação entre os grupos forem significativamente diferentes ($p < 0,05$ em um teste de Monte Carlo com 10.000 iterações), então este táxon pode ser considerado como indicador de um dos grupos. As análises serão realizadas utilizando software livre R (Plataforma R-Studio).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALLISTO, M.; MARQUES, M. M.; BARBOSA, F. A. R. Deformities in larval Chironomus (Diptera, Chironomidae) from the Piracicaba River, southeast Brazil. **Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen**, v. 27, n. 5, p. 2699-2702, 2000.
- CALLISTO, M. et al. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividade de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002.
- DELIBERALLI, W. et al. The effects of heavy metals on the incidence of morphological deformities in Chironomidae (Diptera). **Zoologia (Curitiba)**, v. 35, 2018.
- FERREIRA, W. R.; PAIVA, L. T.; CALLISTO, M. Development of a benthic multimetric index for biomonitoring of a neotropical watershed. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 15-25, 2011.
- FERNÁNDEZ, H. R.; DOMÍNGUEZ, E. Guia para la determinación de los artrópodos bentónicos sudamericanos. **Universidad Nacional de Tucumán**, San Miguel de Tucumán, p. 282, 2001.
- FRANÇA, J.; CALLISTO, M. Coleção de macroinvertebrados bentônicos: ferramenta para o conhecimento da biodiversidade em ecossistemas aquáticos continentais. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2007.
- HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. (Ed.). Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. **Manaus: Editora do INPA**, 1. Ed., 724 p., 2014.
- KLEMM, Donald J. et al. Development and evaluation of a macroinvertebrate biotic integrity index (MBII) for regionally assessing Mid-Atlantic Highlands streams. **Environmental Management**, v. 31, n. 5, p. 656-669, 2003.
- LEGENDRE, Pierre. A temporal beta-diversity index to identify sites that have changed in exceptional ways in space–time surveys. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 3500–3514, 2019.
- MERRITT, Richard W.; CUMMINS, Kenneth W. (Ed.). **An introduction to the aquatic insects of North America**. Kendall/Hunt Pub. Co., Iowa, USA, 1996.
- MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. (Ed.). Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro. **Rio de Janeiro-RJ: Technical Books Editora**, 1. ed., p. 174, 2010.
- TRIVINHO-STRIXINO, Susana. Larvas de Chironomidae: guia de identificação. **São Carlos: UFSCar**, v. 1, n. 2, 2011.

ICTIOFAUNA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dr. Jorge Abdala Dergam	Coordenador	UFV
Dr. Tomas Hrbek	Coordenador de Sub-projeto de análises genéticas, genética de populações e barcode, realização das análises estatísticas, auxílio na elaboração de relatórios	UFAM
Dra. Izeni Pires Farias	Pesquisador de auxílio com análises genéticas, análises estatísticas e elaboração de relatórios	UFAM
Dr. Áureo Banhos	Pesquisador de auxílio com análises genéticas e ecológicas, realização das análises estatísticas, auxílio na elaboração de relatórios	UFES
Msc. Simone Gomes Duarte e Moura	Processos de compra, monitoramento de almoxarifado, envio de remessas e preparo de reagentes.	UFV
Érico Macedo Polo	Auxiliar na parte da bioinformática e biologia computacional associada com a triagem, montagem e arquivamento de dados genéticos.	UFAM
Dra. Taís Guimarães	Análise de dados ecológicos em laboratório; gerenciamento das planilhas de dados, elaboração de mapas e relatórios.	UFV
Dr. Lucas Marcon	Encarregado das análises de gônadas.	UFV
Dr. Víctor De Queiroz	Identificação e triagem de peixes.	UFV
Msc. Késsia Leite de Souza	Identificação e triagem peixes em laboratório e edição de imagens.	UFV
Dra. Paula Coelho	Realiza análise de conteúdo estomacal, monitoramento de planilhas de dados brutos, conferir dados, elaboração de relatórios parciais	UFV
Dr. Fábio de Lima Muniz	Responsável pela amplificação da região barcode, preparo de bibliotecas genômicas, triagem dos dados e montagem dos barcodes para cada espécie. Auxilia na elaboração de relatórios.	UFAM
Dra. Carlos Eduardo Faresin	Preparação das bibliotecas para sequenciamento. Triagem e montagem dos dados genéticos, análises estatísticas populacionais dos dados dos genes mitocondriais e nucleares e auxílio na elaboração de relatórios.	UFAM

Dra. Valéria Nogueira Machado	Responsável pela preparação das bibliotecas para sequenciamento, responsável pelas análises estatísticas populacionais dos dados dos microssatélites e auxilia na elaboração de relatórios.	UFAM
Vinícius Comastri	Triagem de material de peixes e conteúdo estomacal e contrapartida de treinamento e inclusão.	UFV
Cidimar Estevam de Assis	Identificação de peixes de água doce (sistemática).	UFV
Dr. Bruno Edésio dos Santos Melo	Logística de campo, avaliação ambiental dos pontos de coleta, triagem do material.	UFV
Dr. Lucas Caetano de Barros	Trabalho de campo, avaliação ambiental dos pontos de coleta, triagem do material.	UFV
Dra. Natália Martins Travençoli	Identificação e triagem peixes em laboratório e edição de imagens.	UFV
Msc. Ingrid de Souza Nunes	Extração de DNA; coleta, triagem e PCR dos dados do projeto barcode e genética de populações (sequências). Preparação das bibliotecas para sequenciamento.	UFAM
Msc. Sandra Marcela Hernandez Rangel	Preparação das bibliotecas para sequenciamento; coleta, triagem e PCR dos dados do projeto genética de populações (sequências e microssatélites).	UFAM
Msc. Sarah Ventura Carvalho	Extração de DNA; auxílio no gerenciamento dos DNAs; coleta, triagem e PCR dos dados do projeto genética de populações (microssatélites). Preparação das bibliotecas para sequenciamento.	UFAM
Msc. Pedro Senna Taylor Bittencourt	Preparação das bibliotecas para sequenciamento; coleta, triagem e PCR dos dados do projeto genética de populações (sequências e microssatélites).	UFAM

2. 2.ESCOPO

Plano de Trabalho visa a continuidade do monitoramento da ictiofauna dulcícola, envolvendo pesquisadores e docentes da UFV (Universidade Federal de Viçosa) e da UFAM (Universidade Federal do Amazonas), tendo em vista que nos três primeiros anos de monitoramento se observou uma tendência de aumento da abundância e frequência de espécies não nativas no Baixo Rio Doce ao longo do monitoramento, particularmente no reservatório da UHE Mascarenhas sobre a ictiofauna nativa, tanto por uma possível fragmentação e impossibilidade de transposição de espécies nativas, como por ser um local propício para a proliferação e consequente dispersão de espécies não nativas. Neste ambiente de reservatório, assim como na Lagoa Palmas, as espécies não nativas foram dominantes na comunidade tanto em abundância como em biomassa.

O aumento dessas espécies não nativas na comunidade também é observado quando se considera a proporção de espécies amostradas antes e após o rompimento da barragem do Fundão (PMBA, 2020),

onde a proporção de espécies não-nativas aparentemente aumentou na comunidade após 2015. Esta tendência está dentro do esperado: após desastres ambientais ocorridos na China e no Paquistão, onde foi observada a dispersão de espécies não nativas (MAINKA e MCNEELY, 2011). Para o planejamento de longo prazo, Mainka e McNeely (2011) propõem três elementos-chave: a compreensão do estado e das tendências da biodiversidade, a integração da conservação nos esforços de recuperação do desastre e o apoio político para a integração da conservação ambiental.

Considerando a variação temporal e espacial da composição da ictiofauna dentro e entre os pontos monitorados do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA) (relatório anual RRDM 2020), observou-se que a comunidade amostrada tende a ser mais dissimilar ao longo do tempo dentro de cada ponto e entre os pontos.

A integração dos dados obtidos nos estudos da Econservation-Renova, Convênio UFV-Renova e o PMBA permitiu observar que a composição e diversidade da ictiofauna nativa na bacia do Rio Doce é influenciada pela presença das espécies não nativas. Em termos de diversidade alfa e beta, observa-se que as áreas afetadas pelo rompimento da barragem possuem uma riqueza de espécies introduzidas significativamente maior que as áreas não afetadas e uma diversidade beta menor que as áreas não afetadas. Esse resultado sugere que as espécies introduzidas estão amplamente distribuídas nas áreas afetadas e que essa distribuição tende a homogeneizar a fauna e reduzir a diversidade beta, configurando uma ameaça real para as espécies nativas.

Os dados de barcoding indicam que algumas espécies (por exemplo, o Acará *Geophagus brasiliensis*, a Traíra *Hoplias malabaricus* e a Curvina *Pachyurus adspersus*) apresentam variantes compatíveis com a existência de espécies crípticas. Apesar dessa complexidade, os padrões de distribuição dessas variantes podem ser informativos dos processos de repovoamento da calha do Baixo Rio Doce após a passagem do rejeito de minério. As sete espécies que foram estudadas com técnicas de genética de populações utilizando marcadores de microsatélites, mostraram estatísticas (G-W) que indicam gargalo populacional nessa região.

Os resultados moleculares do PMBA indicam que a diversidade funcional das espécies nativas das comunidades está diminuindo (mesmo após 4 a 5 anos do desastre), e essa diversidade funcional não está sendo totalmente compensada pelas espécies introduzidas. Claramente existe uma inércia tipo *extinction debt* (dívida de extinção), devido à baixa velocidade de restauração do ambiente (a qual pode, em parte, ser um efeito do isolamento causado pelas barragens ao longo da calha do rio). Essa simplificação funcional das assembleias dos peixes nativos tem uma tendência à persistência e precisa ser mais bem amostrada e entendida, principalmente porque identificou-se que a simplificação das espécies nativas pode estar sendo parcialmente compensada pelas espécies não nativas.

Reconhecendo a proposta da International Union for the Conservation of Nature, que define os riscos dos ecossistemas com base nas ameaças à biota nativa característica dos ecossistemas, é necessária a continuidade do monitoramento das comunidades de peixes e de macroinvertebrados na bacia do Rio Doce, nas áreas de reservatórios e de sítios de referência não impactados pelo rejeito.

A continuidade temporal permitirá ampliar o conhecimento e acompanhar a evolução/reorganização

das comunidades aquáticas, dessa forma, a proposta metodológica envolve as análises ecológicas (realizadas pela UFV) e genéticas (realizadas pela UFAM) de peixes do ambiente dulcícola. A nova malha de ecologia e genética de peixes foi redefinida, para adequar o máximo possível, os pontos de coleta e a frequência das equipes da área biótica do PMBA.

3. 3. OBJETIVO

Determinar as variações espaço-temporais da ecologia e da genética dos peixes de água doce do Baixo Rio Doce, incorporando pontos de coleta considerados como positivos de impacto (o reservatório da UHE Eliezer Batista) e negativos de impacto (Rio Manhuaçu) no estudo das comunidades de peixes.

4. 4. METAS E JUSTIFICATIVAS

a continuidade do monitoramento das comunidades de peixes e de macroinvertebrados na bacia do Rio Doce, nas áreas de reservatórios e de sítios de referência não impactados pelo rejeito. A continuidade temporal permitirá ampliar o conhecimento e acompanhar a evolução/reorganização das comunidades aquáticas. Esse conhecimento será útil para subsidiar medidas de mitigação, acompanhar as tendências de melhoria do ecossistema e recuperar os serviços do ecossistema.

Este Plano de Trabalho proposto no novo ciclo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática permitirá uma melhor compreensão das tendências temporais da diversidade de peixes, para melhor definir se os locais da calha e os afluentes representam sumidouros e fontes de metapopulações das espécies nativas de peixes, durante o processo de recolonização e, na medida do possível, determinar as relações bióticas entre as espécies nativas e delas com as espécies não nativas, para compreender os processos de recomposição das comunidades ícticas.

META 1 - Avaliação ecológica da ictiofauna

Dessa forma, as metas para o sub-projeto ecologia são:

Submeta 1.1.: Acompanhar a evolução temporal da estrutura da comunidade de ictiofauna nativa e introduzida (riqueza, abundância, biomassa, diversidade), possibilitando entender padrões de distribuição, tendências de aumento da abundância e frequência de espécies não nativas sobre a biota que podem implicar na perda da diversidade de peixes no Baixo Rio Doce;

Submeta 1.2.: Identificar variáveis ambientais que melhor explicam os padrões de composição de ictiofauna observada;

Submeta 1.3.: Determinar a guilda trófica para todas as espécies amostradas, a fim de compreender a dinâmica da comunidade aquática e as relações tróficas entre as espécies nativas e não nativas.;

Submeta 1.4.: Avaliar a relação gonadossomática (RGS) de cada indivíduo, o índice gonadal (IG) e a variação temporal da RGS (limitadas às espécies mais abundantes), permitindo avaliar a adaptabilidade e sucesso reprodutivo das espécies nativas e não nativas, com o intuito de compreender os processos de colonização e recuperação do Rio Doce.;

META 2 - Avaliação genética da ictiofauna

Submeta 2.1.: Caracterizar e monitorar diversidade genética de sete espécies representativas da diversidade taxonômica da ictiofauna do rio Doce com o intuito de rastrear o status atual e evolução temporal da mesma.;

Submeta 2.2.: Caracterizar as novas espécies e novos registros via DNA barcoding e sequenciamento complementar (marcadores nucleares), permitindo entender complexos de espécies, apontar a existência de espécies crípticas, parâmetros importantes para o entendimento de processos de repovoamento da calha do Baixo Rio Doce após a passagem do rejeito.;

Submeta 2.3.: Caracterizar as comunidades locais (diversidade filogenética alfa) e as diferenças entre as comunidades (diversidade filogenética beta) usando DNA barcoding e sequenciamento complementar (marcadores nucleares). Os marcadores microsatélites podem indicar tendências de diversidade genética para populações locais das espécies analisadas.

5. PRODUTOS

4.1 DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
<i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	<i>(Pessoal Vinculado)</i>
Planilhas e relatórios sobre ecologia de peixes: listagem de espécies coletadas, petrecho de amostragem, biometria dos indivíduos (comprimento padrão, comprimento total, pesagem, estádios de maturação gonadal, pesagem das gônadas, determinação de guildas tróficas, identificação de origem da espécie na bacia). Tal como, análises de abundância, riqueza e biomassa e avaliação de dieta e reprodução dos peixes.	Jorge Dergam e UFV
Planilhas e relatórios sobre genética de peixes: caracterização da variabilidade genética das espécies através dos microsatélites e genes mitocondriais e nucleares, diversidade filogenética alfa e beta utilizando DNA barcoding, identificação molecular de linhagens/espécies utilizando o marcador mitocondrial COI.	Tomas Hrbek e UFAM

4.2 ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
<i>(Relacionar as análises)</i>	<i>(Pessoal Vinculado)</i>

Integração dos dados de ecologia e genética de peixes e ecologia de macroinvertebrados do ambiente dulcícola.	Jorge Dergam

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

A coleta da ictiofauna é realizada utilizando-se o esforço amostral de nove redes de espera, representando uma área de cobertura total de 90 m² com diferentes malhas de igual área (10 m²): malha 3 representando 15mm entre nós opostos; malha 4, 20 mm; malha 5, 25mm; 6, 30mm; 7, 35mm; 8, 40mm; 10, 50mm; 12, 60mm e malha 14 representando 70mm entre nós opostos. As redes são colocadas às 16hs e retiradas às 20h, totalizando quatro horas de exposição. Adicionalmente, 10 passadas com rede de arrasto representando uma área de cobertura total de 250 m² e 46 lances de tarrafa representando uma área de cobertura total de 1300 m² também são realizados em cada ponto. Em todos os pontos serão aplicadas as mesmas metodologias e com o mesmo esforço amostral, sempre tentando maximizar as amostragens em todos os ambientes de cada ponto de coleta (Figura 12 e Tabela 8), com frequência de amostragem trimestral. Conforme definido em reunião realizada em julho de 2018, com representantes do PMBA, da Renova e do CT-BIO, a exposição das redes é de aproximadamente 4 horas (16 às 20 horas), para garantir a qualidade e quantidade de peixes amostrados para análises genéticas e de conteúdo estomacal. O risco de danos aos peixes aumenta nos lagos e lagoas, onde a predação por piranhas aumenta com o tempo de exposição das redes. Após a coleta, ainda no campo, todos os peixes são anestesiados com eugenol e fixados em solução de formalina 10% ou álcool etílico 100%.

No laboratório os espécimes são triados, identificados e submetidos a análises biométricas. O estômago e as gônadas dos espécimes são retirados e armazenados em álcool etílico 70% para análises estomacais e de desenvolvimento gonadal. Todos os espécimes têm tecido muscular amostrado para estudos de cunho molecular e são transferidos, em solução de álcool etílico 70%, para depósito na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen, na Universidade Federal de Viçosa – UFV. Junto com a coleta de ictiofauna são obtidos parâmetros abióticos como temperatura, pH (pH e mVORP), turbidez, salinidade, oxigênio dissolvido (OD% e ppmDO) e condutividade (µS/cm e µS/cm²), utilizando uma sonda multiparâmetro (Hanna - HI9829).

Figura 12: Mapa com localização das estações de monitoramento propostas para atendimento do PMBA, Ambiente Dulcícola, tema Ictiofauna Dulcícola.

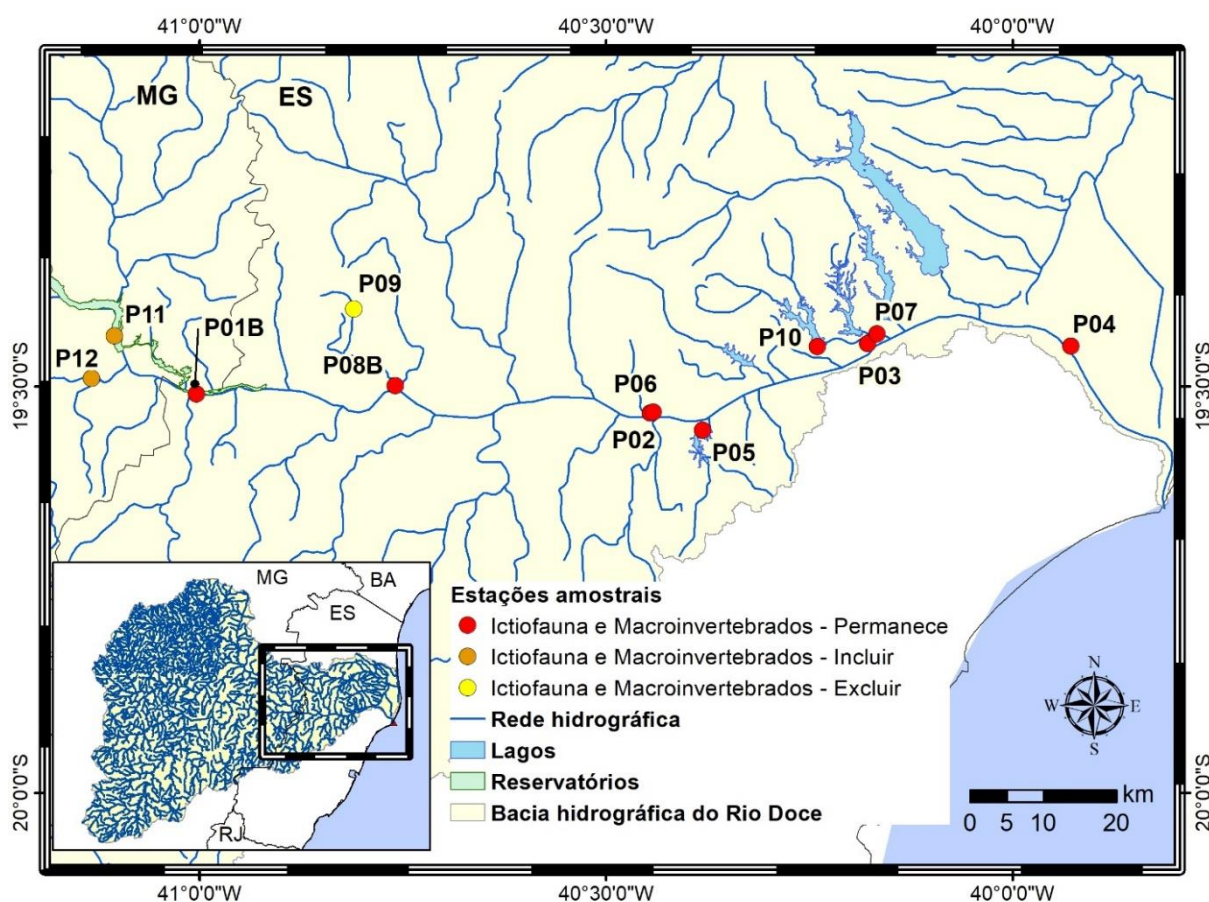


Tabela 8: Comparação entre as malhas amostrais atuais do PMBA e a nova proposta para o Ambiente Dulcícola, tema Ictiofauna Dulcícola.

Código	Ambiente/Município	Situação	X (UTM)	Y (UTM)
P01B	Calha Rio Doce – Reservatório UHE	Permanece	289743	7841597
	Mascarenhas/Baixo Guandu-ES			
P02	Calha Rio Doce/Marilândia-ES	Permanece	348378	7839577
P03	Calha Rio Doce/Linhares-ES	Permanece	376384	7849263
P04	Calha Rio Doce/Linhares-ES	Permanece	402605	7849080
P05	Lago do Limão/Colatina-ES	Permanece	355148	7837322
P06	Lago do Óleo/Marilândia-ES	Permanece	348731	7839743
P07	Córrego Ribeirão das Palmas/Linhares-ES	Permanece	377545	7850618
P08B	Calha Rio Doce/Colatina-ES	Permanece	315430	7842984
P09	Córrego São Pedro Frio/Colatina-ES	Excluída	369855	7848788
P10	Lago das Palmas/Linhares-ES	Permanece	289743	7841597
P11*	Calha Rio Doce – Reservatório UHE	Incluir	279082	7849382
	Aimorés/Aimorés-MG			
P12*	Rio Manhuaçu/Aimorés-MG	Incluir	276153	7843540

* Coordenadas UTM dos pontos 11 e 12 poderão sofrer alteração para possibilitar melhor acesso.

De acordo com aspectos discutidos durante as jornadas de revisão das diretrizes do monitoramento, esta proposta de trabalho tem como objetivo aprimorar o grau de comparação entre os pontos afetados e não afetados pelo rejeito nos ambientes lóticos. Assim, propõe-se a retirada do ponto 9 (P09) do PMBA, localizado no córrego São Pedro Frio, e a adição de outros dois pontos, por um localizado no rio Manhuaçu e outro no reservatório de Aimorés. Essa alteração é importante visto que o ponto 9, sendo uma drenagem de cabeceira, não permite a utilização dos mesmos petrechos de coleta utilizados na calha do Rio Doce, o que dificulta a comparação dos dados entre locais afetados e não afetados. A adição do ponto no rio Manhuaçu, ambiente mais semelhante ao Rio Doce, supre essa carência de locais não afetados no monitoramento da ictiofauna e adicionará uma importante contribuição para o entendimento dos processos ecológicos que estão ocorrendo na região do monitoramento. Além disso, a adição do ponto no reservatório de Aimorés possibilitará compreender melhor a influência da fragmentação hidrográfica provocada pelos barramentos na comunidade de peixes.

6.2. META 1 - Análise dos dados ecológicos.

6.2.1. Estrutura e dinâmica das populações e comunidades de ictiofauna.

Curvas de acumulação de espécies, que demonstram o número acumulado de espécies ao longo das campanhas, serão geradas para cada ambiente monitorado (Calha do Rio Doce, córregos e lagoas) utilizando a função *specaccum* (método random). Já, as curvas de rarefação, que calcula o número esperado de espécies em função do número de indivíduos, serão geradas com a função *rarecurve*. Ambas funções estão disponíveis no pacote *Vegan* do R (OKSANEN et al., 2020).

Além disso, serão realizadas estimativas de riqueza total, modeladas por meio de curva do coletor considerando os seguintes estimadores: Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, ACE e ICE, e Bootstrap (COLWELL; CODDINGTON, 1994). Já, para a descrição da comunidade serão apresentados 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 da aplicação de procedimento 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); Índices de Dominância (MCNAUGHTON, 1968). Para avaliar a influência das características ambientais sobre a distribuição das espécies serão realizadas análises de correspondência canônica (CCA) e/ou regressões múltiplas utilizando matrizes de distâncias (MRM). Análises de dissimilaridade da comunidade entre períodos sazonais e entre pontos também poderão ser realizadas utilizando as abordagens de partição da diversidade beta (BASELGA, 2012) e diversidade beta temporal (LEGENDRE, 2019).

6.2.2. Ecologia Trófica

Todas as espécies coletadas continuarão tendo seus conteúdos estomacais analisados, visando ter uma abordagem mais ampla possível sobre a estrutura trófica nos locais amostrados. Os itens

alimentares são analisados até o menor nível taxonômico possível, utilizando diversas chaves de identificação (MERRITT; CUMMINS, 1996; COSTA et al., 2006; MUGNAI et al., 2010). A quantificação dos itens alimentares é feita seguindo o método volumétrico (HELLAWELL; ABEL, 1971; HYSLOP, 1980) e após a quantificação, calcula-se a porcentagem de contribuição alimentar de cada item. Para identificar se as espécies nativas e introduzidas que consomem os mesmos itens alimentares em cada ambiente amostrado (calha do rio, lagoa e córrego) e em cada grupo trófico (apenas para espécies que ocorrem na calha do rio), é realizada uma análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS), utilizando o índice de Bray-Curtis como medida de similaridade entre a dieta das espécies.

6.2.3. *Biologia Reprodutiva*

A avaliação da biologia reprodutiva será realizada com prioridade nas espécies mais abundantes. Indivíduos das espécies a serem analisadas terão suas gônadas retiradas, pesadas (g) e identificadas quanto ao sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal (VAZZOLLER, 1996). A relação peso-comprimento das gônadas é determinada pela equação $Wt = aLt^b$, onde W é o peso total (g), L o comprimento total (mm), a corresponde ao intercepto (coeficiente de crescimento inicial ou fator de condição) e b representa o coeficiente alométrico (coeficiente de crescimento ou táxons de crescimento relativa do peixe) (LE CREN, 1951; JOBLING, 2002). A proporção sexual entre macho e fêmea (M:F), é calculada de acordo com o número total de machos dividido pelo número total de fêmeas (VAZZOLLER, 1996).

A avaliação dos estágios de desenvolvimento gonadal é realizada com base nas classificações macroscópica e microscópica, seguindo a metodologia proposta por Vazzoller (1996), conforme consta no TR4. Após avaliação macroscópica, fragmentos das gônadas são desidratados em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%) e embebidos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semi-seriadas de 3 μ m são obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2255), para se obter o intervalo de no mínimo 40 μ m entre os cortes e as lâminas obtidas são coradas com azul de toluidina com borato de sódio 1%. As lâminas são fotografadas em fotomicroscópio óptico Olympus BX53, acoplado a câmera Olympus DP73 utilizando o software CellSens Imaging.

A relação gonadossomática (RGS), o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS são também calculadas. A relação gonadossomática é uma relação entre o peso da gônada e o peso do indivíduo e pode ser expressa por: $RGS1 = Wo/Wt \times 100$. Onde Wo = peso das gonadas; Wt = peso total. Já o índice gonadal, ao fazer essa relação de peso da gônada e peso do indivíduo, utiliza o coeficiente linear da relação peso comprimento (VAZZOLLER, 1996). O "índice" gonadal, também denominado fator de condição gonadal, é expresso por: $IG = Wo/Lt^b$, onde Wo = peso das gonadas; Lt = comprimento total. b = coeficiente angular da regressão Wt/Lt (VAZZOLLER et al., 1989). Os cálculos do fator de condição sob a influência do peso das gônadas (K) e sem o peso das gônadas (K') e fator de condição gonadal (ΔK) são efetuados conforme Vazzoller (1981, 1996): $K = Wt / L^{sb}$; $K' = Wc/L^{sb}$; onde, $Wc = Wt - Wg$; Wt , peso total (g); Wc , peso total menos o peso da gônada; Ls , comprimento total (mm); Wg , peso da gônada; Wt , peso total do peixe; b , coeficiente de alometria obtido através da relação peso-comprimento; $\Delta K = K - K'$. O período reprodutivo é estabelecido por meio da análise mensal do fator de condição, comparando-os com a curva de maturação, com base na variação mensal do índice

gonadossomático médio. O aumento dos valores do IG é relacionado com a variação do fator de condição para determinar o período reprodutivo, período esse em que ocorre maior investimento nas gônadas.

As amostras dos tecidos de peixes coletados no Ano 1 e Período de Transição, além de amostras disponíveis na coleção zoológica da Universidade Federal de Viçosa, foram e continuarão a ser enviadas ao Laboratório de Evolução e Genética Animal - LEGAL da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde serão organizadas para as abordagens dos estudos genéticos.

6.3. META 2 - Genética de populações

Visando a continuidade do monitoramento genético-populacional, serão mantidas as análises das sete espécies que apresentaram número amostral suficiente por ponto. Marcadores moleculares microssatélites específicos foram desenvolvidos para essas espécies e além deles, serão sequenciados os genes mitocondriais Citocromo c oxidase subunidade I (COI) e Citocromo b (Cytb), bem como os genes nucleares Myh6 e Glyt.

Resumidamente foram testados 20 loci de microssatélites para *Astyanax lacustris*, *Deuterodon intermedius*, *Geophagus brasiliensis*, *Pachyurus adspersus*, *Hoplias malabaricus*, *Knodus moenkhausii* e *Poecilia vivipara*, dos quais os 10 mais polimórficos foram selecionados.
<https://github.com/legalLab>

Para genotipar as amostras, cada microssatélite selecionado será amplificado para cada indivíduo de cada espécie separadamente. Em seguida, os produtos das amplificações de cada microssatélite serão juntados formando um pool para cada indivíduo. Esses pools serão purificados usando o método de purificação com PEG, a fim de eliminar os fragmentos pequenos e restos de reagentes que podem consumir os adaptadores na etapa seguinte. Posteriormente, será feita a ligação dos adaptadores contendo as sequências identificadoras de cada indivíduo. Em cada uma das extremidades dos fragmentos serão ligados dois tipos de adaptadores, o adaptador A (N = 20) e o adaptador P (N = 20), respectivamente, de modo que o número de combinações de sequências identificadoras seja correspondente ao número de combinações possíveis entre os diferentes adaptadores (N = 400). Assim, cada indivíduo receberá uma combinação única de sequências identificadoras.

Após a ligação dos adaptadores, os *pools* de microssatélites por indivíduo serão purificados novamente e misturados de forma equimolar para a formação das bibliotecas genômicas de cada espécie. As bibliotecas então serão cortadas no Pippin Prep (Sage Science), a fim de selecionar somente os fragmentos com tamanho ideal para processamento no sequenciador de Nova Geração (Next Generation Sequencing - NGS) ION TORRENT PGM. Por fim, um novo pool contendo todas as espécies será formado para compor a biblioteca genômica final, sendo este aplicado em dois chips ION PGM 318 (Life Technologies™), cada um com capacidade de gerar aproximadamente 5 milhões de leituras únicas (*reads*). Portanto, os microssatélites de todas as espécies selecionadas para genética de populações serão obtidos a partir de um único processamento de genotipagem por sequenciamento

(Genotyping-by-Sequencing - GBS).

Foi desenvolvido um *pipeline* que aplica métodos de bioinformática de processamento de dados genéticos para automatizar a “extração” dos microssatélites obtidos através do NGS. Especificamente, o *pipeline* separa todas as leituras de cada espécie por meio dos *primers* específicos que foram desenhados para cada uma delas, permitindo no máximo três erros de leituras para cada sequência. Em seguida, as leituras de cada indivíduo (*reads*) são demultiplexadas por meio da identificação da sequência identificadora da espécie, permitindo, no máximo, dois erros de leitura para cada sequência. As sequências barcode serão previamente inseridas nos adaptadores de cada espécie para permitir tal demultiplexação a *posteriori*, via processamento de bioinformática.

Em seguida à individualização das *reads* de cada indivíduo de cada espécie, serão filtrados somente os *loci* que continham pelo menos 10 *reads*. Esse número mínimo de réplicas permite escolher com confiabilidade os alelos presentes na amostra, uma vez que algumas *reads* podem conter erros de sequenciamento que causam variações no tamanho das sequências, não sendo essas de alelos diferentes, mas sim artefatos do sequenciamento. Por esse motivo, quanto maior o número de *reads* de cada *locus*, maior a confiabilidade na estimativa dos alelos. O *pipeline* calcula o tamanho dos elementos repetitivos para cada alelo de cada *locus* e produz um histograma de densidade que permite a identificação dos tamanhos de fragmentos mais frequentes que são os alelos. Semelhante ao método de genotipagem tradicional, os indivíduos que apresentam apenas um pico de tamanho de fragmentos são considerados homozigotos e aqueles com dois picos são considerados heterozigotos, sendo os alelos determinados pelo tamanho médio dos fragmentos sequenciados. A checagem dos alelos é feita por meio de inspeção visual nos gráficos de densidade que mostram a frequência de cada tamanho de fragmento gerado no sequenciamento. Por fim, o *pipeline* converte os dados para os formatos de entrada nos programas das análises genético-populacionais.

A estrutura genética populacional de cada espécie e entre as populações locais serão medidas por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA) efetuada no programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A AMOVA mede os níveis hierárquicos da distribuição da variabilidade genética e permite estimar os índices de endogamia totais F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} . Também será estimado, para cada espécie, o F_{ST} par a par entre todas as localidades, a fim de verificar o nível de estrutura genética entre populações locais nos diferentes pontos de coleta. Os níveis de endogamia também serão mensurados para cada localidade com o intuito de verificar as populações locais possivelmente mais ameaçadas.

Os testes de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada *locus* serão realizados usando uma abordagem Bayesiana de cadeias de Markov para todos os *loci* de cada espécie no programa Arlequin. Cada cadeia contém 1 milhão de passos, com os resultados parciais sendo gravados a cada 100 mil passos. Os testes de desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium* - LD) serão feitos com 1000 permutações e os valores de significância serão determinados pelo teste exato de p e teste de Chi-quadrado, considerando os respectivos graus de liberdade na comparação entre os diferentes *loci*.

Os principais índices de diversidade genética: número de alelos, amplitude no tamanho dos alelos e heterozigosidade esperada (H_e) serão estimados para cada *locus* de microssatélite, considerando

todas as populações, a fim de medir o grau de polimorfismo dos *loci*. Além disso, os índices de diversidade: número médio de alelos, amplitude média do tamanho dos alelos e diversidade gênica, serão estimados para cada população local (ponto amostral), a fim de identificar quais pontos detêm maior diversidade genética e quais estarão mais vulneráveis do ponto de vista da conservação.

6.3.1. DNA Barcoding e diversidade filogenética

Para as análises com DNA *Barcoding* serão sequenciadas amostras de até cinco indivíduos de cada espécie nova de peixe que for coletada. Os DNAs genômicos das amostras e os genes de interesse serão amplificados, seqüenciados. As sequências serão então alinhadas e editadas junto com o banco de sequências barcode já existente para as análises genéticas subsequentes. Essa amostragem também será utilizada para a realização de uma análise complementar: a estimativa do índice de diversidade filogenética. O intuito dessa análise é medir a variação temporal desse índice na comunidade de peixes do baixo Rio Doce e usá-lo como proxy para o monitoramento da diversidade filogenética e funcional, e as mudanças sofridos pela ictiofauna da região ao longo do tempo.

A região barcode do gene mitocondrial COI será amplificada usando a combinação dos iniciadores COIFishF.2 (5'-TTRTGGRGCTACAAICCC-3') e COIFishR.1 (5'-TACTTCIGGGTGICCRAAGAAAYCA-3') (COLATRELI et al., 2012).

Antes de realizar as análises de *barcoding*, será verificada a correta identificação taxonômica das amostras através da Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), sendo feita reanálise de características morfológicas externas dos espécimes quando necessário.

Para determinar as relações filogenéticas entre as espécies e populações de peixes coletados será utilizada a metodologia do DNA *Barcoding* (HEBERT et al., 2004) que usa o gene COI + árvore de *neighbor-joining* + modelo evolutivo Kimura - 2 - parâmetros. Entre os métodos que usam distâncias genéticas, o *neighbor-joining* é um dos mais usados, principalmente por causa da sua eficiência computacional, especialmente quando a quantidade de sequências analisadas é muito grande. Este método funciona em passos, minimizando a soma dos comprimentos dos ramos a cada passo do processo de agregação ("clusterização") das sequências (KUMAR et al., 2008).

Para as análises de delimitação baseadas nos princípios da coalescência, o banco de dados de sequências será reduzido a haplótipos únicos usando a função hapCollapse (<http://github.com/legalLab/protocols-scripts>). Em seguida, serão geradas árvores filogenéticas ultramétricas no programa BEAST 2.5.1 (BOUCKAERT et al., 2014) sob o modelo de substituição de nucleotídeos TIM3 + G inferido como o melhor modelo de evolução molecular no programa JmodelTest 2.1.10 (POSADA, 2008). O relógio molecular utilizado será o log normal relaxado não correlacionado e o modelo evolutivo coalescente de tamanho populacional constante (seguindo MONAGHAN et al., 2009). Serão executadas três corridas independentes de 20.000.000 de gerações de MCMC com árvores e parâmetros amostrados a cada 2.000 gerações e, após será verificada a convergência; as corridas serão combinadas no LogCombiner 2.5.1 (RAMBAUT et al., 2018). A convergência dos parâmetros e o tamanho efetivo da amostra (ESS > 200) serão verificados no Tracer 1.7 (RAMBAUT et al., 2018). Uma árvore de máxima credibilidade do clado será obtida após o burn-in de 1.000 árvores

usando TreeAnnotator (BOUCKAERT et al., 2014). Todas as análises serão feitas no R v3.6.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

A delimitação de espécies de um único locus será feita a partir de quatro métodos, utilizando as sequências geradas neste projeto e as sequências do alto Rio Doce provenientes do trabalho de SALES et al. (2018). Os métodos de delimitação utilizados serão: (1) GMYC, o modelo coalescente geral de Yule (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013); (2) bGMYC, uma implementação Bayesiana do GMYC (REID; CARSTENS, 2012) e (3) mínimo local (locMin), uma otimização de limite de distância e abordagem de agrupamento do pacote de software spider_1.3-0 (BROWN et al., 2012). Todas as análises serão realizadas no R v3.6.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). As metodologias seguirão os padrões preestabelecidos em Machado et al. (2018).

Para as análises de filogenia de comunidades de peixes do Rio Doce será selecionada uma sequência de cada espécie previamente identificada. Os cálculos serão realizados entre assembleias (por ano). A reconstrução filogenética será obtida por meio da análise de Máxima Verossimilhança no programa RAXML v.8.0 (STAMATAKIS, 2014) utilizando o modelo de substituição GTR + I + G, selecionado via critério de informação de Akaike implementado no programa JmodelTest 2.1.10 (POSADA, 2008). A árvore filogenética obtida no RaxML preserva os comprimentos dos ramos e é utilizada para o cálculo da diversidade filogenética. A diversidade filogenética (*Phylogenetic diversity*- PD) será calculada de acordo com o modelo proposto por FAITH (1992), a qual é definida como o comprimento total do ramo medido pela árvore, incluindo todas as espécies da assembleia. A função PD também retorna a riqueza de espécies (*species richness*- SR).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASELGA, A. The relationship between species replacement, dissimilarity derived from nestedness, and nestedness. **Global Ecology and Biogeography**, v. 21, n. 12, p. 1223–1232, 2012

BEIER, S. et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. **Bioinformatics**, v. 33, n. 16, p. 2583-2585, 2017.

BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS computational biology**, v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.

BROWN, S. D. J. et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular ecology resources**, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.

COLATRELI, O.P.; MELICIANO, N.V.; TOFFOLI, D.; FARIAS, I.P.; HRBEK, T. Deep Phylogenetic Divergence and Lack of Taxonomic Concordance in Species of *Astronotus* (Cichlidae). **International Journal of Evolutionary Biology**, vol. 2012, Article ID 915265, 8 pages, 2012.

COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. magurra A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological**

Sciences, v. 345, n. 1311, p. 101-118, 1994.

COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C. **Insetos imaturos. Metamorfose e Identificação**. Ribeirão Preto: Holos, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FAITH, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological conservation**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1992.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.

HELLAWELL, J. M.; ABEL, R. A rapid volumetric method for the analysis of the food of fishes. **Journal of fish Biology**, v. 3, n. 1, p. 29-37, 1971.

HERBERT, P.D.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **PNAS**, Vol. 101 (41) 14812-14817, 2004.

HYSLOP, E. J. Stomach contents analysis—a review of methods and their application. **Journal of fish biology**, v. 17, n. 4, p. 411-429, 1980.

JOBLING, M. **Environmental factors and rates of development and growth**. In: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. (Org.). Handbook of fish biology and fisheries. Fish biology. USA: Blackwell, p. 97-122, 2002.

KUMAR, S. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.

LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, p. 201-219, 1951.

LEGENDRE, Pierre. A temporal beta-diversity index to identify sites that have changed in exceptional ways in space–time surveys. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 3500–3514, 2019. DOI: 10.1002/ece3.4984.

MACHADO, V. N. et al. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

MAGURRAN, A. E. Ecological diversity and its measurement. **Princeton university press**, 1988.

MAINKA, S. A.; MCNEELY, J. Ecosystem considerations for postdisaster recovery: lessons from China, Pakistan, and elsewhere for recovery planning in Haiti. **Ecology and Society**, 16(1): 13, 2011.

- MANLY, B. F. J. A method for the estimation of parameters for natural stage-structured populations. **Population Ecology**, v. 39, n. 2, p. 101-111, 1997.
- MCNAUGHTON, S. T. Structure and function in California grasslands. **Ecology**, v. 49, n. 5, p. 962-972, 1968.
- MERRITT, R. M.; CUMMINS, K. W. **An introduction to the aquatic insects of North America**. Iowa: Kendall Hunt, 1996.
- MONAGHAN, M. T. et al. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic biology**, v. 58, n. 3, p. 298-311, 2009.
- MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro: para atividades técnicas, de ensino e treinamento em programas de avaliação da qualidade ecológica dos ecossistemas lóticos**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010.
- OKSANEN, J. et al. **vegan:Community Ecology Package**. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2020.
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.
- R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAMBAUT, A. et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic biology**, v. 67, n. 5, p. 901-904, 2018.
- REID, N. M.; CARSTENS, B. C. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2012.
- SALES, N. G. et al. Hidden diversity hampers conservation efforts in a highly impacted Neotropical river system. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 271, 2018.
- SMITH, B.; WILSON, J. Bastow. A consumer's guide to evenness indices. **Oikos**, p. 70-82, 1996.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: reprodução e crescimento**. CNPq, 1981.
- VAZZOLER, A. E. A. M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. **EDUEM**, Maringá, p. 169, 1996.

ANEXO

AMBIENTE COSTEIRO

SUMÁRIO

SUMÁRIO EXECUTIVO	129
PRAIAS	132
RESTINGA	153
MANGUEZAL	178

SUMÁRIO EXECUTIVO – AMBIENTE COSTEIRO

Os grupos temáticos de Praias, Restinga e Manguezal, que realizam monitoramento deste 2018, revelam que as consequências da incorporação dos rejeitos do material oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG) foram percebidas, de forma integrada, entre as variáveis abióticas e bióticas, o que resultou na proposta de reunir os temas no Ambiente Costeiro.

Ambientes costeiros como praias, restingas, manguezais, deltas e estuários são caracterizados pela transição continente-oceano e refletem variações ocorrentes nos ambientes dulcícola e marinho, pois recebem tanto a carga fluvial transportada através da bacia hidrográfica como o material retrabalhado constantemente na plataforma continental, tanto por carga de fundo quanto em suspensão. Os processos geomorfológicos e as alterações sazonais das forçantes hidrológicas e oceanográficas imprimem a morfodinâmica complexa do sistema costeiro, que sustenta o equilíbrio dos ecossistemas instalados e suas condições adaptativas ou impactadas por processos poluentes.

Nesse sentido, o tema Praias monitora a adaptação dos organismos bentônicos presentes na praia emersa, em sedimentos arenosos, e na antepraia, nos sedimentos, lamosos areno-lamosos e arenosos, buscando analisar alterações nos padrões ecológicos associados às condições estressantes em função da mobilidade e tipologia das praias e à composição geoquímica dos sedimentos. O tema Restinga monitora essencialmente a flora, a partir de inúmeros indicadores (atividade fotossintética, dos metabólitos, reserva de carboidratos, atividade antioxidante, processos reprodutivos), que analisada juntamente ao substrato e às alterações das condições meteorológicas, permite discutir a condição ambiental do sistema. Por fim, o tema Manguezal, com sua alta complexidade, analisa a flora e a fauna do sistema estuarino, onde as variações sazonais sobre a distribuição dos elementos químicos são bem exemplificadas nas condições de produtividade da floresta de mangue e nas populações de *Ucides cordatus*.

Por ser tratar de um ambiente submetidos à e dinâmica fluvial, meteorológica e oceanográfica, a adoção do monitoramento semestral, em condições do período chuvoso (maiores aportes fluviais) e período seco (incremento das condições de vento, ondas e correntes) permite que as imposições ambientais sejam discutidas. Desta forma, no novo ciclo do PMBA, as campanhas dos três temas, quando possível, serão realizadas simultaneamente ou em períodos próximos, para que a observação das mesmas condições hidrológicas e oceanográficas sobre a sedimentação e biota monitorada sejam analisadas de forma integrada, sob condições sazonais distintas.

Quanto ao recorte espacial, a partir dos resultados e da compreensão dos processos morfodinâmicos das praias, foi possível identificar, ao longo do litoral do Espírito Santo monitorado, diferentes compartimentos geomorfológicos costeiros que refletiram, de forma diferenciada, a distribuição dos elementos químicos, a diversidade da biota e os impactos em função da concentração de contaminantes nos sedimentos e água. Esta compartimentação geomorfológica refletiu também nos processos ocorrentes nos temas integrados, como nos cordões litorâneos/dunas, que sustentam a vegetação de restinga e nos processos morfodinâmicos e ecológicos do manguezal.

São estes os seguintes compartimentos:

- Compartimento A: Compreende o litoral sul monitorado, entre Praia Mole (Serra) e Barra do Sahy (Aracruz). O litoral é caracterizado pela presença dos tabuleiros da Formação Barreiras, falésias e terraços de abrasão, esses últimos responsáveis por uma costa recortada e protegida das ondas devido à alta dissipação destas sobre os terraços. As praias são estreitas e frequentemente submetidas a processos de transposição das ondas. A plataforma continental adjacente é rasa e composta predominantemente por areias carbonáticas. Cordões litorâneos e dunas recobertos por vegetação de restinga são associados às praias e nesse recorte se destaca o complexo estuarino dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim. No Compartimento A há a probabilidade de o material resultante do rompimento da barragem alcançar as praias, restingas e estuários, por transporte em suspensão e sob condições de ondas de nordeste. Se destaca neste compartimento, a presença de elementos químicos monitorados no substrato e folhas da vegetação da restinga, facilitada pelos processos erosivos e *spray* marinho. Outras fontes locais, associadas aos terraços de abrasão da Formação Barreiras e aporte fluvial dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim, se relevam também potenciais para os elementos químicos verificados, principalmente nas praias e manguezal dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim.

- Compartimento B: Esse litoral é representado pelo trecho entre a planície sul do rio Doce (estações praias do Riacho, Terra Indígena, Rebio Comboios e Regência), e a porção mais próxima à desembocadura ao norte (praia de Povoação). Ao longo do monitoramento ficou mais definida a atuação da carga e descarga do rio Doce nas estações mais próximas da desembocadura, e que na antepraia e na plataforma continental próxima, é observado o enriquecimento das concentrações de alguns elementos químicos durante o impacto agudo proveniente do aporte do rejeito de mineração, o que resultou, a partir de comparação aos dados pretéritos e ao atual monitoramento, em subdividir o compartimento em B e B', sendo esse último o recorte sob efeito direto da descarga e carga fluvial. O material lamoso alterou a morfologia das praias e permitiu alcance do espraçamento na base da restinga e alcance frequente dos sedimentos marinhos sobre os ecossistemas fluviais de Barra do Riacho e Rio Doce.

- Compartimento C: Corresponde à planície norte do delta do rio Doce, com cordões litorâneos e praias bem desenvolvidos, e corpos d'água onde se destacam o complexo laguna-ilha barreira de Urussuquara e Praia Seca e o estuário de São Mateus. Considerando a localização da desembocadura do rio Doce e o predomínio das correntes de deriva litorânea sentido norte, há o transporte por deriva litorânea para este compartimento. As isóbatas de 5 e 10 metros do Compartimento C, em conjunto com as localidades de Regência do Compartimento B', apresentam depósitos de sedimentos finos com as maiores concentrações de elementos químicos e esta concentração é sentida na biota da praia, restinga e manguezal. Tendo as praias, a antepraia e a plataforma continental interna deste compartimento um menor gradiente, isto é, sendo mais rasa, as alterações sazonais do nível relativo do mar, causadas por ondas de tempestade e marés, propiciam o maior alcance sobre os corpos estuarinos, assim como frequentemente causam a inundação nas praias e facilitam o alcance dos espraçamentos e do *spray* marinho sobre a restinga.

Devido à identificação dos compartimentos, para o monitoramento que se inicia, houve adaptação das estações do tema Restinga, para que fossem representativas dos diferentes processos morfodinâmicos dos compartimentos e que se fizessem alinhadas ou mais próximas às estações praiais, já que as alterações morfodinâmicas das praias interagem diretamente com as variações sazonais nos dados bióticos e abióticos da restinga.

Ao longo do monitoramento, o tema Praias incrementou o número de estações, adotando duas mais extremas: ao sul, praia Mole (Serra) e ao norte, praia de Itaúnas (Conceição da Barra). Contudo, para a nova etapa de monitoramento, duas estações foram excluídas por já estarem representadas por outras no mesmo compartimento, ainda de acordo com a malha amostral da restinga.

Por fim, o tema Manguezal reduziu a abrangência de suas amostragens de 9 para 5 sistemas estuarinos, em 40 parcelas fixas, sendo eles: rio Piraquê-Açu (Aracruz), rio Piraquê-Mirim (Aracruz), Foz do Rio Doce (Linhares), rio São Mateus (Conceição da Barra) e rio Mariricu (São Mateus). Dentre os sistemas excluídos está o estuário do rio Caravelas (Bahia), onde há menor evidência para assumir que a fonte de contaminação sejam metais relacionados com a presença do rejeito de mineração, já que se trata de uma bacia hidrográfica distante do aporte do rio Doce e ainda apresentam outros potenciais aportes devido ao alto uso e ocupação da terra da bacia. As áreas selecionadas para continuidade do monitoramento do manguezal se adequam a região amostral para Praias e Restinga.

As particularidades de cada tema serão apresentadas nos planos de trabalho a seguir, onde será observado que a obtenção de dados hidrodinâmicos e sedimentológicos do sistema costeiro (granulometria e composição dos sedimentos; ventos, ondas e marés; morfologia, dinâmica e transporte de sedimentos) são comuns aos temas e sempre serão analisados de forma integrada a fim de discutir as variações sazonais e respostas sobre os parâmetros bióticos.

PRAIAS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dra. Jacqueline Albino	Coordenação de Ambiente e Temática	DOC/UFES
Dr. Dieter Muehe	Pesquisador Pós-Doc	DOC/UFES
Dr. Luiz Henrique Sielski de Oliveira	Pesquisador Pós-Doc	DOC/UFES
Dra. Giseli Modolo Machado	Pesquisador Pós-Doc	DOC/UFES
Dr. Pablo Medeiros Jabor	Pesquisador Doutor Especialista em Geoprocessamento	DOC/UFES
A definir	Pesquisador Profissional Pleno II	DOC/UFES
Denise de Sousa Paiva Tagliari	Pesquisador Profissional Sênior II	DOC/UFES
Lucas Bermudes de Castro	Pesquisador Profissional Pleno II	DOC/UFES
A definir	Pesquisador Júnior	DOC/UFES
Isabele Correia dos Santos	Pesquisador Iniciação Científica	DOC/UFES
Alexandre Burini	Pesquisador Iniciação Científica	DOC/UFES
Matheus Franca	Pesquisador Iniciação Científica	DOC/UFES
Julyana Caprini Fardin	Pesquisador Iniciação Científica	DOC/UFES
Dra. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima	Coordenação Temática	DQUI/UFES
Dra. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde	Pesquisador Doutor II	DQUI/UFES
Dr. Jefferson Rodrigues de Souza	Pesquisador Doutor II	UENF
Maiara Krause	Doutor I	DQUI/UFES
Larissa Dias Roriz	Profissional Pleno II	DQUI/UFES
Tiago Pereira Cunha	Profissional Pleno II	DQUI/UFES
Suellen Gerônimo Cordeiro	Mestre/Técnico Sênior	DQUI/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	DQUI/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	DQUI/UFES
Ema Karolyane Barbosa Gireli	Pesquisador Iniciação Científica	DQUI/UFES
Rômulo Solveira Rodrigues	Pesquisador Iniciação Científica	DQUI/UFES
Dra. Karla Gonçalves da Costa	Coordenação Temática	CEUNES/UFES
Dra. Vanessa Simão do Amaral	Doutor I Especialista em Análises Ambientais	CEUNES/UFES
Dra. Tathiana Guerra Sobrinho	Pesquisador Doutor Especialista em Arthropoda não Crustacea e análises estatísticas	CEUNES/UFES
MSc. Jacqueline de Almeida Neves	Profissional Pleno II	CEUNES/UFES
MSc. Gean Zanetti	Profissional Pleno II	CEUNES/UFES
MSc. A definir	Profissional Pleno II	CEUNES/UFES
MSc. Bruna A. Coelho Teixeira	Profissional Júnior	CEUNES/UFES
A definir	Profissional Júnior	CEUNES/UFES
Emanuely Ezídio da Silva	Profissional Júnior	CEUNES/UFES
Isabela Jabour e Silva	Profissional Júnior	CEUNES/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	CEUNES/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	CEUNES/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	CEUNES/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	CEUNES/UFES
A definir	Pesquisador Iniciação Científica	CEUNES/UFES

2. ESCOPO

A possibilidade de contaminação das areias das praias adjacentes levou à retirada e relocação de ninhos de tartaruga para outras praias e, ainda, à proibição de banho de mar, prejudicando as atividades econômicas e recreacionais na região costeira. Neste sentido, a segurança ao banho/balneabilidade do litoral atingido e a fauna associada ao sistema praial necessitam ser avaliadas para que respostas sejam dadas à sociedade o mais prontamente possível. Através de estudos e monitoramento praial de curto e longo prazo, busca-se obter respostas para as seguintes questões:

1. Como se dá a propagação de contaminantes via transporte longitudinal e transversal (da plataforma para a praia)?
2. Quais as alterações, e sua distribuição espacial e temporal, causadas pelo evento sobre a estrutura física das praias (topografia e sedimentologia) e sobre a composição química do sedimento?
3. Como ocorre a interação do clima de ondas e da morfologia da praia e antepraia com os demais ambientes costeiros e qual a responsabilidade dos processos morfodinâmicos da praia na distribuição de poluentes para estes outros ambientes?
4. Quais as características da fauna bentônica nas praias da região e quais as diferenças encontradas nas áreas atingidas que possam ser associadas ao rompimento da barragem (composição, espécies/grupos indicadores, sazonalidade, distribuição horizontal, vertical e tipologia de praia, além dos parâmetros ecológicos adotados de riqueza, densidade e equitabilidade)?
5. Quais os aspectos ambientais, associados ao evento, responsáveis pelas alterações no meio biótico do sistema praial afetado?
6. Qual a resiliência das praias afetadas, destacando os fatores principais que definem a capacidade de recuperação das praias?
7. Quais as espécies/grupos indicadores das praias afetadas? E como é a resposta desses aos indicadores da contaminação ao longo do tempo? Seriam os mesmos para os diferentes segmentos do litoral?
8. Considerando a presença de elementos químicos na água, como se dá a distribuição e o transporte desse material ao longo das praias pelas ondas e correntes?
Qual a dimensão dos impactos ecológicos do evento sobre o meio físico e sobre a fauna bentônica das praias afetadas?

3. OBJETIVO

O objetivo geral do projeto é avaliar as condições ambientais da praia e dos ecossistemas costeiros adjacentes, em função da distribuição espacial dos rejeitos e/ou entrada de material poluente e da magnitude dos impactos sobre as atividades ecológicas.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 - Avaliação da morfologia e sedimentologia praial

A caracterização morfodinâmica da praia, bem como do clima de ondas, permitirá avaliar a amplitude da mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (run up) ao longo da praia e das áreas de desova das tartarugas, possibilitando determinar a vulnerabilidade das praias quanto à mobilidade e/ou possibilidade de contaminação nas áreas de proteção. Ainda será possível identificar qualquer mudança ou tendência de variação na topografia das praias em decorrência do acréscimo de finos no sistema praia/plataforma.

META 2 - Caracterização multidecadal do clima de ondas regional

A caracterização multidecadal do clima de ondas regional terá como finalidade embasar a interpretação morfodinâmica de curto e longo prazo, bem como verificar tendências de longo prazo. As informações sobre o clima de ondas permitirão o desenvolvimento de modelos aplicados na interpretação adequada dos processos envolvidos na distribuição do material, na identificação das áreas preferenciais de deposição e, ainda, na discussão da resiliência e adaptação morfodinâmica das praias em função da incorporação da fração lamosa.

META 3 - Mapeamento da alteração da desembocadura do Rio Doce antes e após acidente

O objetivo desta etapa é traçar a evolução da linha de costa sob distintos recortes temporais. Esta análise será realizada para o estabelecimento de mudanças ocorridas em meso e microescala de tempo sob a interrelação dos parâmetros atmosféricos e oceanográficos na desembocadura do Rio Doce.

META 4 - Monitoramento da Fauna Bentônica

A principal característica biológica da região entre marés de uma praia arenosa é a presença de uma diversa e adaptada biota. A macrofauna de praias arenosas inclui a grande maioria dos táxons de invertebrados, sendo os principais grupos os anelídeos poliquetas, crustáceos e moluscos (MCLACHLAN & BROWN, 2006). Os organismos encontrados nesses ambientes contribuem de forma significativa para o fluxo de energia das cadeias tróficas e na reciclagem de nutrientes de fundos marinhos. A distribuição, abundância e diversidade da macrofauna de praias vêm sendo relacionada, principalmente, aos fatores físicos, destacando-se dentre estes a ação das ondas, o tamanho das partículas de sedimento e a declividade da praia (MCLACHLAN, 1983). Porém, fatores biológicos como predação, competição, disponibilidade e busca de alimento, dispersão e assentamento larval, entre outros, também atuam na estruturação da fauna bentônica (KNOX, 2000).

Para monitorar a estrutura da comunidade bentônica marinha sujeita aos impactos provenientes do resíduo de mineração que chegaram nas praias arenosas serão analisadas a distribuição espaço-temporal da meiofauna e da macrofauna bentônica. Através do monitoramento dessa comunidade, associada aos parâmetros físico-químicos do sedimento, será possível identificar como a fauna bentônica vem se comportando e, com isso, saber qual a resiliência dessa comunidade.

META 5 - Monitoramento Geoquímico

A avaliação da concentração de elementos químicos na água e no sedimento é importante no estudo da contaminação e poluição de um ambiente. Sendo assim, o estudo geoquímico do ambiente praias será realizado a partir da análise de água e sedimento. Na água, será realizada a determinação dos parâmetros físico-químicos e da concentração de elementos químicos (total, dissolvido e no material particulado em suspensão). No sedimento será realizada análise mineralógica e a determinação dos elementos químicos. As informações obtidas serão integradas com os dados de morfologia, sedimentologia, clima das ondas e fauna bentônica, usando ferramentas quimiométricas, com o intuito de avaliar a mobilidade dos contaminantes químicos e o impacto causado ao ambiente após o acidente.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS (Dados que serão entregues como produtos)	PESQUISADOR RESPONSÁVEL (Pessoa Vinculada)
Cotas dos perfis topobatimétricos	Dieter Muehe
Classificação granulométrica	Jacqueline Albino
Teores de carbonato	Jacqueline Albino
Teores e classificação visual de minerais pesados	Jacqueline Albino
Teores de matéria orgânica total nas amostras lamosas	Jacqueline Albino
Parâmetros físico-químicos da água	Maria Tereza Carneiro e Geisamanda Brandão
Teores de elementos químicos na água	Maria Tereza Carneiro e Geisamanda Brandão
Teores de elementos químicos no sedimento	Maria Tereza Carneiro e Jefferson Rodrigues de Souza
Caracterização mineralógica por difração de raios-X	Maria Tereza Carneiro e Jefferson Rodrigues de Souza
Coleção de invertebrados marinhos	Vanessa Simão do Amaral
Base de dados da fauna bentônica	Vanessa Simão do Amaral e Gean Zanetti
Densidade de organismos	Karla Costa e Gean Zanetti
Densidade grupos-chave (<i>Saccocirrus pussicus</i> , <i>Hesionura cf. variodentata</i> , <i>Excirolana brasilienses</i> , Amphipoda, Oligochaeta, Nematoda e Copepoda)	Karla Costa e Gean Zanetti
Riqueza taxonômica (S)	Karla Costa e Gean Zanetti
Equitabilidade de Pielou (J) de organismos	Karla Costa e Gean Zanetti
Diversidade de Shannon-Wiener (H')	Karla Costa e Gean Zanetti
Diversidade Beta	Tathiana Guerra Sobrinho e Gean Zanetti

5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises que serão feitas)	PESQUISADOR RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Análise das alterações meteorológicas e das condições hidrodinâmicas (forçantes)	Luiz Henrique Sielski de Oliveira
Mapeamento da alteração da desembocadura do Rio Doce antes e após acidente	Pablo Jabor e Jacqueline Albino
Análise variação espaço-temporal da dos sedimentos detríticos depositados (quanto à granulometria e composição)	Jacqueline Albino
Variação morfológica das praias	Dieter Muehe
Discussão da variabilidade morfodinâmica das praias e do processo costeiro, considerando a integração dos dados sedimentológicos, morfológicos e hidrodinâmicos	Jacqueline Albino e Giseli Modolo Machado
Modelo de transporte de sedimentos e distribuição da energia das ondas	Luiz Henrique Sielski de Oliveira
Análise da distribuição de elementos químicos em água ao longo das praias	Geisamanda Pedrini Brandão
Análise da distribuição de elementos químicos em sedimento ao longo das praias	Jefferson Rodrigues de Souza
Análise dos minerais presentes na fração fina do sedimento (lama) buscando uma assinatura geoquímica	Maria Tereza Carneiro e Jefferson Rodrigues de Souza
Avaliação integrada dos dados geoquímicos	Maria Tereza Carneiro, Geisamanda Pedrini Brandão, Jefferson Rodrigues de Souza
Análise da distribuição espacial da fauna bentônica (macrofauna e meiofauna) na praia e antepraia das áreas adjacentes à foz do Rio Doce	Karla Costa e Vanessa Simão do Amaral
Análises estatísticas das respostas das comunidades de organismos bentônicos aos parâmetros morfodinâmicos e químicos das praias	Tathiana Guerra Sobrinho e Gean Zanetti
Análise e integração de dados morfodinâmicos, bentônicos e químicos e diagnóstico de contaminação das praias	Jacqueline Albino, Maria Tereza e Karla Costa
Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes	Jacqueline Albino, Maria Tereza e Karla Costa

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

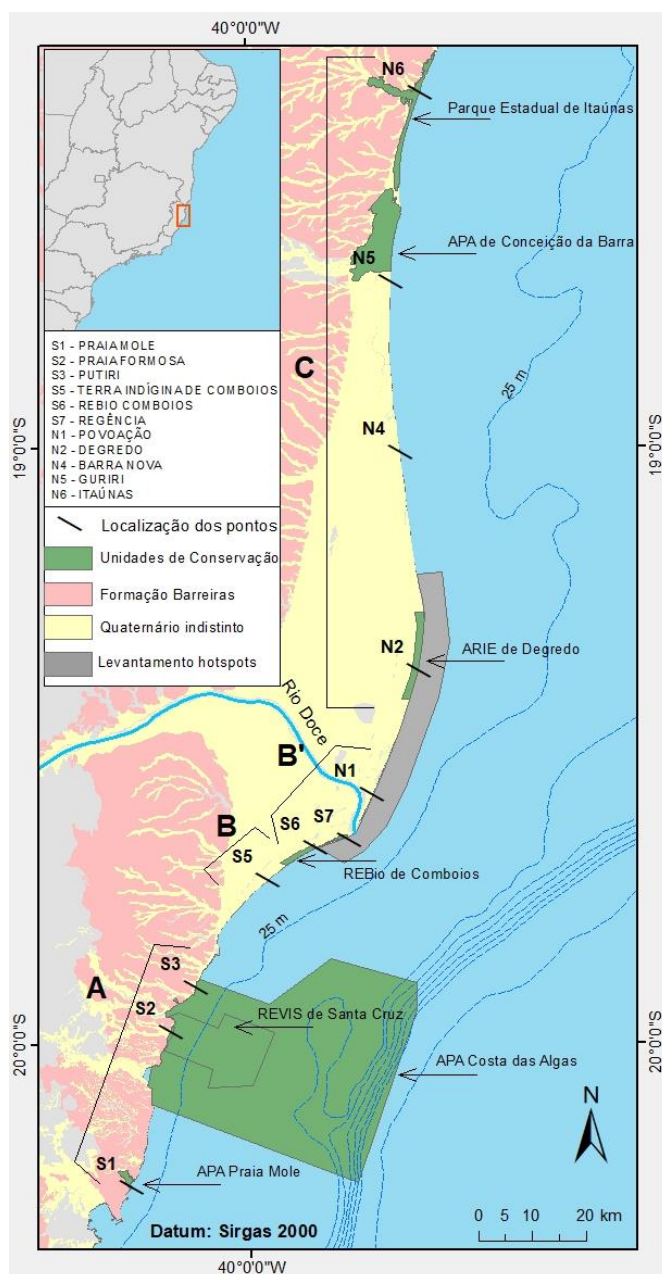
O monitoramento dos sistemas praias adjacentes à desembocadura do Rio Doce será realizado em 11 estações amostrais distribuídas ao longo do litoral norte do estado do Espírito Santo (Tabela 1 e Figura 1), a partir do levantamento topobatimétrico de perfis praias transversais à linha de costa e da coleta de água e sedimento para análises físicas, químicas e biológicas.

As estações ao longo da planície costeira do Rio Doce estão localizadas entre o litoral de Itaúnas e de Aracruz, além de uma estação em Praia Mole, Serra (Figura 1). Vale ressaltar que algumas estações defronte à planície costeira do Rio Doce e mais ao sul, no litoral de Aracruz, encontram-se inseridas em áreas de proteção ambiental, a exemplo da Reserva Biológica de Comboios e da Área de Proteção Ambiental Costa das Algas, respectivamente. Há ainda uma área prioritária para o mapeamento de locais com maior deposição de lama (*hotspots*) na antepraia adjacente à desembocadura do Rio Doce (Figura 1).

Tabela 1: Localização das estações amostrais. Coordenadas em UTM SIRGAS 2000.

ESTAÇÕES AMOSTRAIS	LESTE	SUL
S1 PRAIA MOLE	373218.000	7761498.280
S2 PRAIA FORMOSA	380536.401	7790273.350
S3 PUTIRI	385022.401	7798481.804
S5 TERRA INDÍGENA	398483.467	7818548.413
S6 REBIO COMBOIOS	407367.121	7824486.821
S7 REGÊNCIA	413510.753	7825920.791
N1 POVOAÇÃO	417849.323	7834367.562
N2 DEGREDÓ	426483.792	7857327.479
N4 BARRA NOVA	423038.215	7898015.071
N5 GURIRI	421281.580	7929487.640
N6 ITAÚNAS	426653.000	7964715.000

Figura 1: Representação esquemática da área de estudo, indicando as estações amostrais de coleta e a área provável com maior deposição de lama (*hotspot*), onde será realizado o levantamento sistemático.



O monitoramento, com duração de 18 meses, será realizado a partir de:

- Campanhas semestrais contemplando os períodos seco e chuvoso para análises físicas, químicas e biológicas em todas as estações amostrais.
- Campanhas anuais, associadas a eventos mais severos das condições oceanográficas, porém não contemplados nas campanhas semestrais, para análises físicas, químicas e biológicas em todas as estações amostrais.
- Mapeamento anual dos depósitos de lama encontrados na antepraia, na porção considerada hot spot da deposição de lama, para análises físicas e químicas e avaliação da mobilidade do material sob as diversas condições hidrológicas e meteoceanográficas.

6.2. Metas 1, 2 e 3 - Monitoramento da morfodinâmica praial

6.2.1. Caracterização multidecadal do clima de ondas

A avaliação multidecadal do clima de ondas será realizada a partir das principais variáveis estatísticas, como altura significativa (H_s), período de pico (T_p) e direção de pico (θ°) da onda utilizando o módulo AMEVA do SMC Brasil ou processamento equivalente capaz de retornar tanto as variáveis estatísticas descritivas quanto a simulação de eventos de regime extremo. Os dados de longo prazo serão obtidos a partir de modelos globais de ondas superficiais, como o *Global Ocean Waves* (REGUERO et al., 2012), ou NOAA-WW3 (TOLMAN, 2009) validados a partir de comparações com os dados obtidos *in situ* através de equipamentos ADCP, no âmbito do projeto. Caso seja necessário, o comportamento do espectro de ondas será propagado para águas rasas a partir de modelos numéricos, específicos como o SMC-Brasil, Sisbahia ou Delft 3D-WAVE, com resolução de malha adequada à batimetria disponível.

6.2.2. Monitoramento de perfis topobatimétricos

O levantamento topobatimétrico dos perfis praias será realizado nas 11 estações amostrais distribuídas ao longo da área de estudo (Tabela 1 e Figura 1). Os perfis serão levantados a partir de um referencial fixo (marco geodésico previamente instalado) situado além do limite do pós-praia e se estenderão até o limite da antepraia média, correspondente à profundidade de fechamento (isóbata de 10 m).

O levantamento da porção emersa do perfil praial será realizado por meio de posicionamento espacial e altimétrico utilizando um GNSS com função RTK (GNSS/GPS-RTK), que faz correções em tempo real entre o receptor fixo na base e o receptor móvel (*rover*). O levantamento do perfil na zona submarina (antepraia) será realizado com o auxílio de uma embarcação dotada de posicionamento por GNSS/GPS, empregando ecobatimetria monofeixe de dupla frequência, para obtenção da profundidade e da espessura da camada de lama. A navegação e a integração dos dados de posicionamento e profundidade serão realizadas utilizando programas específicos como *Hydromagic*, *Hypack* ou equivalentes.

A acoplagem dos perfis da praia emersa com os da antepraia será feita a partir do ajuste dos dados topobatimétricos ao nível médio do mar com base na previsão maregráfica.

A determinação do estágio morfodinâmico praiar (SHORT & WRIGHT, 1984), utilizada como indicação de sua variabilidade topográfica, será realizada a partir de observações da altura (H_b) e período da onda (T) na arrebentação e sua comparação com a distância (D_{espr}) e duração (T_{espr}) do espraio da onda na face da praia, através da equação proposta por Muehe (1998) (parâmetro Delta):

$$\Delta = \frac{(\sin \beta \cdot D_{espr}) / H_b}{T_{espr} / T}$$

Dados morfológicos em conjunto com o clima de espraio-refluxo da onda na face da praia serão utilizados na determinação do *run up* da onda e do potencial de inundação da praia. Além disso, será possível determinar o ciclo de espraio-refluxo, ou seja, a relação entre o tempo de duração do espraio da onda na face da praia (T_s) e o período da onda (T) para o estabelecimento da relação do regime de fluxo que, segundo Kemp & Plintstone (1968, apud MUEHE, 1995), é definido pela relação T_s/T , sendo:

$$T_s/T < 0,5 \text{ fase baixa}$$

$$0,5 < T_s/T < 1,0 \text{ fase média}$$

$$T_s/T > 1,0 \text{ fase alta}$$

Na fase baixa, o fluxo de espraio e refluxo se completam antes da chegada de uma nova onda. Na fase média, o ciclo é interrompido pela chegada de uma nova onda antes de completar o refluxo, gerando turbulência na parte inferior da face da praia. Na fase alta, não ocorre o refluxo, pois a frequência de chegada das ondas é muito maior que o tempo para completar o ciclo de espraio-refluxo. Neste caso, o escoamento da água acumulada na face da praia tem que ocorrer por percolação e fluxo lateral.

Durante o espraio, parte da água percola através da areia, renovando, desta forma, a água intersticial e trazendo nutrientes para a fauna bentônica. Para esta última, a maneira como se processa o ciclo de espraio, percolação e refluxo da água na face da praia, pode ser um fator importante para compreender diferenças na composição, densidade e diversidade das espécies encontradas, por ser o resultado da interação entre características de topografia, granulometria do sedimento e clima de ondas. Para McLachlan (1990) é o clima de espraio-refluxo das ondas na face da praia (clima de *swash*) e não o clima de ondas, o responsável por modificações nas comunidades bentônicas.

6.2.3. Mapeamento das áreas de maior deposição de lama na foz e adjacências do Rio Doce

O mapeamento sistemático das áreas com maior deposição de lama na antepraia será realizado por meio de levantamentos batimétricos, sonográficos, sedimentológicos e geoquímicos. Os levantamentos serão realizados na antepraia adjacente e ao norte da desembocadura do Rio Doce (Figura 1), onde, ao longo do PMBA/Fest, foram observados elevados teores de lama. Este mapeamento tem por objetivo verificar a distribuição e a mobilidade dos depósitos lamosos na antepraia, depósitos estes

associados ao aporte sedimentar do Rio Doce e, portanto, ao aporte de rejeitos no ambiente costeiro. Este esforço será somado às informações pontuais verificadas ao longo dos perfis batimétricos.

O plano de sondagem dentro das áreas de influência do rio contará com espaçamento de cerca de 1 km entre as linhas de sondagem, com início na zona de arrebentação das ondas até cerca de 10 m de profundidade, buscando incluir a profundidade de fechamento do perfil praial. Este procedimento será realizado através de levantamentos batimétricos com ecobatímetro monofeixe de dupla frequência, sonar de varredura lateral e coleta de sedimento para análise textural e caracterização do tipo de fundo. Um adensamento sistemático do mapeamento será realizado nas áreas com maiores deposições de lama. Este adensamento será realizado com auxílio do sonar de varredura lateral para caracterização da tipologia do fundo. O mapeamento da litologia de fundo será realizado a partir da interpretação dos perfis sonográficos, da avaliação da intensidade de retorno dos sinais acústicos e diferenciação entre sedimentos cascalhosos, arenosos e lamosos. Uma estimativa da espessura da camada lamosa poderá ser realizada a partir da análise da batimetria de dupla frequência. Os dados obtidos nos levantamentos batimétricos poderão ser utilizados ainda em modelagem para a determinação do padrão de chegada das ondas à praia, a fim de avaliar os processos de transporte dos sedimentos. Análises sedimentológicas e geoquímicas serão realizadas para caracterização dos depósitos lamosos. O monitoramento dos sedimentos na área de *hotspots* será realizado semestralmente contemplando os períodos seco e chuvoso.

6.2.4. Análise Sedimentológica

Ao longo do perfil praial emerso serão coletadas amostras de sedimento superficial na berma, a partir da abertura de uma pequena trincheira de aproximadamente 20 cm de profundidade, e na face da praia (face superior e inferior) por raspagem. Ao longo do perfil praial submerso serão coletadas amostras de sedimento superficial na antepraia rasa e nas profundidades de 5 e 10 m. Amostras de sedimentos superficiais ainda serão coletadas na área poligonal, delimitada para o mapeamento dos depósitos de lama na antepraia. O número de amostras coletadas será em função do número de fácies sedimentares encontradas. As amostras na praia submersa serão coletadas com auxílio de uma embarcação e um amostrador de fundo do tipo Van Veen.

As análises sedimentológicas incluirão análises texturais (granulometria) e composicionais (carbonatos, silicatos, minerais pesados e matéria orgânica).

A determinação da granulometria dos sedimentos arenosos será realizada por meio de peneiramento a seco. Os parâmetros estatísticos propostos por Folk & Ward (1957) serão calculados por meio do programa GRADISTAT (BLOTT & PYE, 2001). Para as amostras com percentual de lama superior a 10% será realizada primeiramente a separação entre as frações areia e lama, através de peneiramento via úmida. A granulometria da fração lamosa será determinada por meio de um granulômetro a laser (Malvern).

Quanto à composição, a determinação do teor de carbonato de cálcio (CaCO_3) será realizada a partir de sua queima com ácido clorídrico (HCl). A determinação do teor de minerais pesados será realizada para as amostras arenosas pelo método gravitacional utilizando como líquido de separação o

bromofórmio ou outro líquido denso. Na sequência, a identificação dos minerais pesados será realizada para as amostras da face praial inferior por meio de observação em lupa binocular segundo método proposto por GaleHouse (1971). O teor de matéria orgânica total, por sua vez, será quantificado para as amostras lamosas por meio de sua queima em forno mufla a 450°C durante 4 horas. A partir da diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra será determinado o teor de matéria orgânica total.

6.2.5. Integração morfodinâmica

A caracterização da morfodinâmica da praia e do clima de ondas permitirá avaliar a mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (*run up*) a partir de modelos como os propostos por Stockdon et al. (2006) e Sallenger et al. (2002). Esta informação auxiliará na determinação da vulnerabilidade das praias quanto à mobilidade, potencial de inundação e possibilidade de contaminação das áreas de proteção, como a região de restinga.

O monitoramento permitirá compreender as alterações morfodinâmicas, adaptação e resiliência do sistema praial em função da incorporação, mobilização e redistribuição da fração lamosa incorporada às praias.

6.2.6. Mapeamento das alterações da morfologia e mobilidade da linha de costa

Com o uso da técnica de superposição de imagens georreferenciadas (*overlay*), pode-se observar e calcular as taxas da mudança da linha de costa, sobretudo dos processos de sedimentação e erosão que ocorrem na foz do Rio Doce.

- Análise em meso escala

A análise em meso escala de tempo da variação da linha de costa na área correspondente à foz do Rio Doce será realizada por meio de técnicas de geoprocessamento através da fotointerpretação, juntamente com levantamentos cartográficos da região, conforme metodologia descrita por IJSN (2012). A aplicação das técnicas de geoprocessamento permitirá a identificação de feições morfológicas, possibilitando sua vetorização em escala de detalhe dada área de estudo ser espacialmente pequena. A metodologia inclui:

- Aquisição de dados históricos: com a finalidade de relatar os processos ocorridos, serão utilizadas fotografias aéreas e eventualmente imagens de satélite de alta resolução de diferentes períodos anteriores ao desastre. Nesta etapa serão consultados diferentes órgãos e empresa do estado do Espírito Santo, como o Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), o Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do ES (IDAF) e Instituto Jones dos Santos Neves (IJSN).
- Georreferenciamento das fotografias aéreas: este processo será realizado para todas as imagens que não venham de sua fonte georreferenciadas, para tanto, será aplicada transformação polinomial de 1ª ordem, com a coleta de pontos de controle em tela, utilizando como referência fotografias aéreas ortorretificadas do IEMA/ES (2012/2015), que possuem resolução espacial de 0,25 metros (PAN) e 0,55m (RGBI).

- Extração da linha de costa: as linhas de costa serão digitalizadas com a utilização do software de geoprocessamento QGIS, considerando o limite atingido durante a preamar, baseando-se na mudança nítida de tonalidade nas areias da praia ou margem do rio.
- Análise da variação da linha de costa: será possível verificar as variações dos indicadores da posição da linha de costa utilizando a ferramenta de análise digital da linha de costa DSAS 4.0 (THIELER et al., 2009). Trata-se de uma ferramenta de análise que calcula tais variações com alto nível de precisão aliado a uma baixa exigência computacional, o DSAS opera a partir da inserção de uma linha de base vetorial, paralela à costa, no banco de dados geográficos. Esta linha serve como referência inicial para construção digital dos perfis transversais (espaçados em 20 metros) necessários para as análises.
- Com os perfis DSAS definidos as linhas de costa serão inseridas em um mesmo arquivo vetorial, devidamente identificadas pela data. O sistema calcula as distâncias entre linha de base criada no início dos perfis e cada uma das linhas de costa obtidas. Essas informações permitem conhecer as distâncias de variação da linha de costa.
 - Análise de microescala

As atividades de monitoramento em campo para a obtenção de dados para o desenvolvimento das atividades de análise da variação da posição dos indicadores da linha de costa, serão realizadas em três campanhas por ano ao longo dos 2 anos do projeto.

Os registros da posição da linha de costa e dos perfis transversais serão realizados utilizando um GNSS/GPS-RTK percorrendo toda extensão da desembocadura do Rio Doce em processo de caminhamento, que consistem em conduzir a antena sobre os indicadores selecionados registrando as posições das linhas de costa.

O aparelho GNSS/GPS-RTK rastreia o sinal de diferentes constelações de satélites como GLONASS, GALILEO e GPS simultaneamente com técnica de posicionamento cinemático em tempo real (*real time kinematic* - RTK) na qual o posicionamento é corrigido por um par de antenas conectadas entre si via rádio frequência. Uma das antenas é fixada sobre um referencial com posição conhecida para estabelecer a estação base, enquanto a antena móvel é conduzida pelos pontos que devem ser posicionados. Através da conexão de rádio entre as antenas é possível realizar o processamento dos dados (MONICO, 2008), com determinação do posicionamento em tempo real, com grande precisão. Este método é genericamente denominado topo contínuo ou “*onthe fly*”.

A análise de microescala de tempo da variação da linha de costa será realizada com a ferramenta de análise digital da linha de costa DSAS 4.0.

Entre as possibilidades metodológicas de análise descritas no manual do DSAS, o método SCE (*shoreline change envelope*) será aplicado para realização das análises de variabilidade dos indicadores. Este método verifica a maior variação em metros da linha de costa para cada perfil. Os resultados serão obtidos pela diferença das distâncias entre o início do perfil e as interseções com as linhas de costa mais próxima e mais distante. Ou seja, será possível verificar a distância de duas linhas

de costa para uma linha de base estabelecida (THIELER et al., 2009). O método resulta no valor da máxima variação registrada de posição do indicador da linha de costa para o período do estudo.

6.3. Meta 5 - Monitoramento Geoquímico

A praia é um ambiente de transição entre a planície costeira e a plataforma continental sendo suas características físicas e químicas frutos da interação entre estas duas unidades geomorfológicas (ALBINO, 1999). Em linhas gerais o ambiente praial pode ser dividido em dois setores principais, a antepraia (parte submersa) e a praia (parte emersa). Considerando a dinâmica e a importância do ambiente praial para os processos costeiros, sua influência sobre os ecossistemas existentes nessa região costeira, torna-se extremamente relevante o monitoramento ambiental e avaliação presença de elementos químicos, principalmente os elementos potencialmente tóxicos tanto na praia quanto na antepraia. O sedimento da praia é constituído basicamente por areia, que é um sedimento de origem mineral, cuja composição química é majoritariamente quartzo (SiO_2), podendo conter também minerais dispersos, como feldspato, entre outros. No entanto, devido à dinâmica das praias o transporte de sedimentos é muito intenso e a chegada de material fino também pode acontecer na praia (berma e face), região onde ocorre a maior utilização para fins de lazer por parte da população, e é, geralmente, escolhida como área de desova das tartarugas marinhas. Adicionalmente, considerando a dinâmica geofísica do sistema praial, torna-se importante também realizar o monitoramento hidrogeoquímico da fração submersa (antepraia) mediante a determinação de elementos tanto no sedimento superficial e na coluna d'água. Assim, o monitoramento geoquímico das praias será realizado mediante a análise de água e sedimento.

6.3.1. Procedimentos de campo

A coleta de amostras de água e sedimento será realizada concomitantemente ao estudo da morfologia e sedimentologia das praias. A coleta das amostras de sedimento superficial na praia (berma e face praial superior) deve ser realizada com coletores de plástico ou PTFE, a fim de evitar a contaminação das amostras. Após o procedimento de amostragem, as amostras de sedimento serão mantidas refrigeradas em sacos plásticos tipo ZipLock devidamente identificados.

Nas isóbatas de 5 m e 10 m e no polígono, definido pelo mapeamento dos maiores depósitos de lama na antepraia, a coleta de sedimento será realizada com auxílio de um amostrador de fundo do tipo Van Veen. O sedimento, posteriormente, será transferido para bandejas plásticas e, com o auxílio de um coletor de plástico serão amostradas porções de diferentes pontos do sedimento (quando possível). As amostras serão, então, transferidas para sacos plásticos do tipo ZipLock. Vale destacar que, durante a coleta das amostras, o sedimento que entrou em contato com a superfície interna do amostrador não será amostrado, para tanto, a camada superior do sedimento será descartada antes da amostragem. O amostrador Van Veen será ainda lavado abundantemente com água do próprio ponto de coleta para evitar contaminação cruzada entre as amostras coletadas em diferentes pontos. Após o procedimento de amostragem, as amostras de sedimento serão mantidas refrigeradas em caixa térmica.

As amostras de água de fundo serão coletadas nas isóbatas de 5 e 10 m com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn. Ao chegar à superfície, as amostras de água serão transferidas para garrafas plásticas descontaminadas e posteriormente mantidas refrigeradas a 4°C na sala fria da embarcação ou em caixa térmica. A amostra de água que será utilizada para a determinação do teor total de elementos químicos deverá ser acidificada a $\text{pH} < 2$ no momento da coleta, enquanto a amostra para determinação de elementos dissolvidos e material particulado em suspensão (MPS) será coletada sem acidificação. Durante a coleta das amostras de água serão determinados os parâmetros físico-químicos com auxílio de um medidor multiparâmetros portátil.

6.3.2. Pré-Tratamento das amostras

- Sedimento

No laboratório, as amostras deverão ser secadas em estufa a 60°C até peso constante. Após a etapa de secagem, será separada a fração granulométrica menor que 1 mm, realizado o quarteamento para obtenção de uma fração representativa e homogênea, que será armazenada em sacos plásticos em dessecador até o momento da pesagem para os procedimentos de preparo que antecedem às análises.

Decomposição parcial do sedimento será realizada (EPA 3051a) visando obter a concentração de elementos químicos no sedimento. A decomposição total (EPA 3052), será realizada visando a determinação dos elementos terras raras. Serão preparados brancos analíticos para todos os procedimentos de preparo.

Decomposição Parcial

Para o procedimento de extração parcial (pseudo total) dos elementos químicos das amostras de sedimento será utilizado o método normalizado US EPA 3051A (2007). Será pesado aproximadamente 250 mg da amostra de sedimento seco ($\emptyset$ partículas < 1mm) em frasco de Teflon próprio para o uso no forno micro-ondas, e adicionado 9mL de HNO_3 concentrado e 3 mL de HCl concentrado. Após a adição dos ácidos, as amostras serão deixadas em repouso por aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente dentro da capela (etapa de pré-decomposição). Ao final desse período, os frascos serão fechados adequadamente e submetidos à decomposição assistida por radiação micro-ondas. Será utilizado um programa de temperatura que consiste em uma rampa de aquecimento de $5,5 \pm 0,25$ min até atingir a temperatura de $175 \pm 5^\circ\text{C}$ e uma permanência de 4,5 min a temperatura de $175 \pm 5^\circ\text{C}$; e um tempo de resfriamento de 10 min. Após esse período será retirado o rotor do micro-ondas e mantê-lo por um período de aproximadamente 30 min à temperatura ambiente dentro da capela para posterior abertura dos tubos. Ao final, a solução será filtrada utilizando funil de polipropileno e papel de filtro quantitativo (Faixa azul) de 12,5 cm e transferida quantitativamente o filtrado para um tubo de polipropileno, avolumando para 25 mL com água ultrapura de resistividade 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$.

Decomposição total

Para a decomposição total das amostras de sedimentos visando a determinação dos elementos terras raras será utilizado o método normalizado US EPA 3052 (1996). Esse procedimento será realizado apenas em amostras coletadas na isóbata de 10 m e na face superior de cada estação amostral. Será

pesado aproximadamente 250 mg da amostra de sedimento seco ($\varnothing$ partículas < 1mm) em frasco de Teflon próprio para o uso no forno micro-ondas, adicionado 9 mL de HNO_3 , 3mL de HF, 2 mL de HCl e 1,2 g de H_3BO_3 . O ácido bórico deverá ser adicionado para promover a complexação do fluoreto remanescente. Após a etapa de pré-decomposição (aproximadamente 15 minutos), à temperatura ambiente, na capela, os frascos serão fechados adequadamente e submetidos à decomposição assistida por radiação micro-ondas. Será utilizado um programa de temperatura que consiste em aquecimento até $180 \pm 5^\circ\text{C}$ em aproximadamente 5,5 minutos e mantendo nesta temperatura por 9,5 minutos; um tempo de resfriamento de 10 min. Após esse período o rotor do micro-ondas será retirado e mantê-lo por um período de aproximadamente 30 min à temperatura ambiente dentro da capela para posterior abertura dos tubos. Ao final, a solução será filtrada utilizando funil de polipropileno e papel de filtro quantitativo (faixa azul) de 12,5 cm e transferida quantitativamente o filtrado para um tubo de polipropileno, avolumando para 25 mL com água ultrapura de resistividade 18 M Ω .cm.

- Água

As amostras de água serão analisadas visando a determinação de elementos químicos dissolvido, total e no material particulado em suspensão (MPS).

Elementos químicos dissolvidos

Para a determinação da fração dissolvida, a amostra de água deverá ser filtrada em membrana de porosidade 0,45 μm . Uma alíquota da amostra filtrada deverá ser recolhida e acidificada utilizando HNO_3 subdestilado até pH <2. A amostra acidificada deverá ser armazenada a 4°C até análise.

Elementos químicos totais

A determinação da fração total dos elementos químicos na água será realizada pelo método normalizado US EPA 3015A (2007). Será transferida uma alíquota de 20mL da amostra de água homogeneizada para um frasco de Teflon próprio para o uso no forno micro-ondas, 4mL de HNO_3 concentrado será adicionado, o frasco será fechado adequadamente e submetido a solução à decomposição assistida por radiação micro-ondas. Será utilizado um programa de temperatura que consiste em aquecimento à 175°C em 5,5 min e permanência por 4,5 min. Após o período de resfriamento dos tubos, será transferido quantitativamente a solução para um tubo de polipropileno, avolumando para 25 mL com água ultrapura de resistividade 18 M Ω .cm. As soluções resultantes serão armazenadas sob refrigeração em geladeira até o momento da análise.

Material particulado em suspensão (MPS)

A determinação da quantidade de material particulado em suspensão (mg/L) será realizada pela diferença de massa obtida antes e após a filtração em membrana filtrante de porosidade 0,45 μm .

Para determinação dos elementos químicos nas amostras de material particulado em suspensão será utilizada a decomposição pseudo total conforme o método normalizado US EPA 3051A (2007).

O filtro seco será pesado contendo a amostra de MPS em frasco de Teflon próprio para o uso no forno micro-ondas, e adicionado 9 mL de HNO_3 concentrado e 3 mL de HCl concentrado. Após a adição dos

ácidos, as amostras serão deixadas em repouso por aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente dentro da capela (etapa de pré-decomposição). Ao final desse período, os frascos serão fechados adequadamente e submetidos à decomposição assistida por radiação micro-ondas. Será utilizado um programa de temperatura que consiste em uma rampa de aquecimento de $5,5 \pm 0,25$ min até atingir a temperatura de $175 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e uma permanência de 4,5 min a temperatura de $175 \pm 5^{\circ}\text{C}$; e um tempo de resfriamento de 10 min. Após esse período será retirado o rotor do micro-ondas e mantê-lo por um período de aproximadamente 30 min à temperatura ambiente dentro da capela para posterior abertura dos tubos. Ao final, a solução será filtrada utilizando funil de polipropileno e papel de filtro quantitativo (Faixa azul) de 12,5 cm e transferida quantitativamente o filtrado para um tubo de polipropileno, avolumando para 25 mL com água ultrapura de resistividade 18 M Ω .cm.

6.3.3. Análise das amostras e tratamento dos dados

Determinação elementar

A determinação dos elementos químicos será realizada por ICP OES, modelo Optima 7000DV (PerkinElmer, USA), ICP-MS Nexlon 300D (PerkinElmer, USA) e AAS (AnalytikJena, Alemanha). Os elementos determinados serão: alumínio (Al), arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), estanho (Sn), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), vanádio (V), zinco (Zn). Elementos terras raras também serão determinadas no sedimento por ICP-MS visando a busca de uma assinatura geoquímica. Mercúrio será determinado pelo Analisador Direto de Mercúrio DMA-80 (Milestone, Italy).

Difração de Raios-X

A caracterização mineralógica dos sedimentos será realizada por Difração de Raios-X nas amostras coletadas nas isóbatas, após a separação da fração silte e argila.

Tratamento de dados

Os resultados das análises realizadas serão avaliados estatisticamente em termos de estudos de correlação e análise exploratória de dados, seguindo os princípios da Quimiometria. Aos dados será aplicado a técnica de Análise por Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Clusters (HCA). Os dados serão tratados nos *softwares* Microsoft Excel, Matlab e MINITAB.

As análises e interpretação serão realizadas a partir da integração dos dados de morfodinâmica da praia, sedimentologia das areias, e composição bentônica.

6.4. Meta 4 - Monitoramento da Fauna Bentônica

Para o monitoramento da estrutura da comunidade de invertebrados bentônicos marinhos ocorrerão coletas semestrais e, ocasionalmente, em eventos climáticos (ressacas, ondas, ventos, chuvas intensas) para amostragens da macrofauna e meiofauna nas praias do litoral norte do Espírito Santo. O objetivo do monitoramento é avaliar os impactos provenientes do resíduo de mineração sobre os

parâmetros da comunidade da fauna bentônica marinha em praias arenosas sob possível influência da pluma de sedimento. Nessa região, dados anteriores a chegada da lama e aqueles obtidos pelo PMBA/Fest serão usados para fins de comparação.

6.4.1.Procedimentos de campo

As coletas serão realizadas em 11 estações amostrais distribuídas ao longo do litoral norte do Espírito Santo (Figura 1), em diferentes faixas de praia: antepraia (infralitoral), face praial (mesolitoral) e berma (supralitoral), sempre em maré baixa de sizígia. Em cada estação, serão realizados três transectos, onde serão coletadas amostras em quatro níveis: berma (supralitoral), face superior (mesolitoral superior), face inferior (mesolitoral inferior) e antepraia rasa (infralitoral). O mesolitoral é o local que compreende a distância entre a linha da maré mais alta e o limite inferior de recuo máximo das ondas no horário previsto para a maré mais baixa de sizígia. O supralitoral encontra-se acima do mesolitoral, em direção a duna e o infralitoral é a região submersa, onde as amostras serão coletadas a uma profundidade aproximada de 1 m. Será coletada uma amostra de macrofauna e uma amostra de meiofauna em cada um dos níveis de cada transecto, totalizando 12 amostras de cada componente bentônico por estação amostral (as amostras serão coletadas em triplicata em cada faixa de cada ponto). As coletas nas isóbatas de 5 e 10 m, realizada em triplicata, será feita embarcada com auxílio de draga Van Veen, totalizando 6 amostras por ponto amostral.

Macrofauna

Na praia emersa, as amostras serão tomadas com coletores cilíndricos de 15 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade. Nas isóbatas, as amostras serão coletadas com pegador de fundo do tipo Van Veen. Todas as amostras da macrofauna serão lavadas em água do mar no próprio campo, em malha de 0,5 mm de abertura. Após lavadas, serão acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e fixadas em álcool etílico 70%, garantindo a preservação de dados moleculares e morfológicos para estudos futuros.

Meiofauna

Para a meiofauna as amostras serão coletadas com coletores cilíndricos de 2 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade. Nas isóbatas, as amostras serão coletadas em triplicata com pegador de fundo do tipo Van Veen, de onde inicialmente serão retiradas as amostras de meiofauna (2 cm de diâmetro e até 10 cm de profundidade, quando possível) e o restante será usado para a análise da macrofauna. Todas as amostras serão diretamente acondicionadas em frascos plásticos etiquetados, fixados em solução de formalina a 10% e adicionado corante rosa de bengala para melhor visualização dos organismos no momento da triagem em laboratório.

6.4.2.Processamento das amostras

Todas as amostras de sedimento para as análises da fauna bentônica (macro e meiofauna) serão encaminhadas ao Laboratório de Ecossistemas Marinhos do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Em laboratório, a macrofauna será triada manualmente e os organismos encontrados serão identificados até a menor categoria taxonômica possível sob microscópio estereoscópico e óptico, com auxílio de bibliografia especializada e enviados aos especialistas quando necessário. A meiofauna das amostras da porção emersa será extraída do sedimento por elutriação em água, sendo o sobrenadante passado em peneira de 0,063 mm de abertura e triagem manual. No entanto, como as amostras das isóbatas são lamosas e com sedimento muito fino (diferente das amostras da porção emersa e antepraia rasa), a meiofauna será extraída por um processo de flotação em solução de açúcar com densidade 1,14 g/ml, como descrito por Esteves *et al.* (1995). O tratamento constitui em agitação manual das amostras e repouso. Após 40 minutos as amostras serão lavadas em malha de 0,063 mm. Em seguida serão armazenadas e fixadas com solução de formol a 10%. Com essa metodologia, a meiofauna é totalmente separada do sedimento, facilitando a triagem e a preparação das lâminas para identificação.

Posteriormente, o material será identificado ao nível de grandes grupos em placas de Dollfus compostas por 200 quadrados utilizando, para tal, um microscópio estereoscópio.

6.4.3. Análise dos dados

De posse dos dados referentes aos atributos físico-químicos presentes no ambiente, como a granulometria e as concentrações dos elementos químicos, serão feitos testes estatísticos para verificar como a diversidade de invertebrados bentônicos responde às concentrações de tais elementos. As variáveis resposta (dependentes) num primeiro momento serão os parâmetros de diversidade básicos da comunidade: densidade, riqueza de espécies observada, Diversidade de Shannon-Wiener (H' , $\log_2$) e equitabilidade (J' de Pielou) e as variáveis explicativas (independentes) serão os tipos morfológicos das praias, bem como o período de amostragem (seca ou chuvosa), além das concentrações dos principais elementos químicos advindos do rejeito. Para tais testes serão realizadas análises de covariância (ANCOVA), adequadas quando existem variáveis X tanto categóricas quanto contínuas nos modelos. Além disso, os mesmos protocolos de análises descritos para os parâmetros da diversidade bentônicas também serão realizados para grupos-chave, para os quais suas densidades serão sempre as variáveis resposta nos modelos ajustados.

Para todas as análises relativas aos parâmetros numéricos das comunidades (riqueza, densidade, diversidade de Shannon-Wiener e equitabilidade) serão construídos modelos lineares generalizados (GLMs), usando-se as distribuições de erros adequadas e corrigindo sub ou sobre dispersões (WARTON, 2016) quando ocorrerem. Todos os modelos construídos, bem como todos os testes estatísticos serão realizados na plataforma R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2021). Todas as análises serão submetidas a análises de resíduos para verificação das distribuições de erro utilizadas, adequação dos modelos e retirada de possíveis 'outliers'.

Além das análises envolvendo os parâmetros numéricos da comunidade, também serão investigadas as respostas da composição de espécies da macro e meiofauna bentônicas. Primeiramente, análises de ordenação multidimensional do tipo NMDS e PERMANOVA serão realizadas com o intuito de verificar se as composições de espécies variam entre as estações amostrais, bem como entre os

períodos (seco/chuvoso). Nas análises de PERMANOVA, as concentrações dos elementos químicos mais abundantes nas praias serão usadas como variáveis ambientais discriminantes, a fim de verificar se ocorrem agrupamentos de diferentes espécies em locais mais ou menos impactados pela pluma de rejeito. Uma outra abordagem a ser utilizada para verificação dos impactos sobre a composição de espécies das comunidades bentônicas será a decomposição da diversidade beta em seus dois componentes: 'aninhamento' e 'turnover', conforme proposto por Baselga (2010). Os valores de beta 'turnover' e 'aninhamento' serão relacionados com as concentrações dos diferentes tipos de contaminantes; e o esperado é que em locais mais impactados encontremos maiores valores de 'aninhamento' do que de 'turnover', uma vez que a troca natural de espécies por turnover é esperada quando se tem ambientes menos perturbados ou que estejam sofrendo estresses naturais. Por outro lado, impactos severos e antropogênicos tendem a levar a uma perda de espécies nas comunidades, gerando altos valores de 'aninhamento' na decomposição da diversidade beta.

Mais uma vez, tais abordagens e testes robustos no monitoramento da biodiversidade nos permitem responder se as modificações observadas nas comunidades bentônicas são devidas aos impactos por elas experimentados, mesmo embora não tenhamos áreas controles e dados pretéritos. Todas as análises relativas à composição de espécies também serão realizadas na plataforma R, utilizando os pacotes necessários para cada uma delas.

Apesar do tamanho macrofaunal dos poliquetas intersticiais *Saccocirrus pussicus* e *Hesionura* cf. *variodontata*, esses habitam os espaços entre os grãos de sedimento, justificando que sejam tratados como um único grupo funcional, os "poliquetas intersticiais" ou "fauna intersticial" (WESTHEIDE 2008). Quando considerados na macrofauna, a alta abundância desses organismos em praias arenosas, principalmente de grãos mais grossos, causa a superestimação da densidade e biomassa do local (VANOSMAEL, 1982). Dessa forma, visando uma melhor acuidade das análises da macrofauna, os poliquetas intersticiais *S. pussicus* e *H. variodontata* serão retirados das análises dos descritores desse grupo e tratados separadamente como grupos chave.

6.4.4. Coleção

Uma coleção biológica pode ser entendida como um conjunto de organismos, ou partes destes, preservados fora do ambiente natural, isto é, de seu sítio de coleta. Seus componentes são preparados e organizados de modo a informar a procedência e identificação taxonômica de cada um dos espécimes, o que lhe confere status científico. Tais acervos, muito mais que servirem como repositórios de material biológico à pesquisa científica, subsidiam atividades de ensino e importante prestação de serviços, além de apresentarem valioso material de importância histórica. Sumarizando, organizar, qualificar e disseminar a informação taxonômica e biogeográfica, além de promover a conservação *ex situ* de exemplares da biodiversidade são os maiores objetivos de uma coleção biológica.

A importância das coleções científicas, mantidas especialmente nos museus de história natural, é inegável. Algumas dessas coleções são de abrangência mundial, abrigam dezenas de milhões de exemplares e têm um fluxo de visitação ininterrupto de biólogos, ambientalistas e outros

pesquisadores que necessitam consultar o seu acervo. As coleções científicas constituem, de fato, uma fonte crucial de informação para todos os que, por sua atividade, têm contato com seres vivos.

Em 2014, a instituição UFES-CEUNES, recebeu a aprovação do credenciamento como fiel depositária de amostras de componentes do patrimônio genético para a Coleção Zoológica Norte Capixaba – CZNC (Credenciamento nº 114/2014/SECEX/CGEN, publicado no D.O.U nº 200, de 16 de outubro de 2014, Seção 3, página 143.), sendo, portanto, todo produto deste monitoramento tombado na referida coleção, com as autorizações para atividades com finalidade científica SISBIO nºs 64178-7 e 73539-1 e IEMA Proc. nº 89091876, Autorização de Pesquisa NUBIO nº 004-2020 para o Parque Estadual de Itaúnas.

Os indivíduos identificados (macro e meiofauna) serão registrados na Coleção Zoológica Norte Capixaba - CZNC na divisão de invertebrados marinhos. Organismos da macrofauna serão colocados em frascos, fixados em álcool 70%, registrados, numerados, etiquetados e guardados. Os representantes da meiofauna são condicionados em frascos tipo flaconete ou eppendorfs, fixados em álcool, registrados, numerados e etiquetados.

Até o momento, foram registrados 19.974 lotes na CZNC, sendo 5200 lotes para anelídeos, 3465 lotes de crustáceos, 2812 lotes de miscelânea (que incluem os filos menores (e.g., Nemertea, Sipuncula e artrópodes não crustáceos), 3068 lotes de moluscos e 5429 lâminas permanentes de Nematoda.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, J. **Processos de sedimentação atual e morfodinâmica das praias de Bicanga a Povoação, ES**. 1999. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Geologia Sedimentar, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BASELGA, A. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, p. 134–143, 2010.

BLOTT, S. J.; PYE, K. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. **Earth surface processes and Landforms**, v. 26, n. 11, p. 1237-1248, 2001.

ESTEVES, A. M.; ABSALÃO, R. S.; SILVA, V. M. A. P. Padronização e avaliação da eficácia da técnica de flotação na extração da meiofauna em uma praia de areia grossa (Praia Vermelha, RJ). **Publicação Especial do Instituto Oceanográfico**, v. 11, p 223-227, 1995.

FOLK, R.L.; WARD, W. C. Brazos River bar: a study in the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Research**, v. 27, n. 1, p. 3-26, 1957.

GALEHOUSE, J. S. Sedimentation analysis. In: Caver, R. E (Ed). **Procedures in sedimentary petrology**, p. 69-94, 1971.

IJSN. Análise da Variação da Linha de Costa do Espírito Santo. IJSN. NT. 2012.

KEMP, P.H.; PLINSTON, D. Beaches produced by waves of low phase difference. **Journal of the Hydraulics Division**, v. 94, n. 5, p. 1183-1196, 1968.

KNOX, G. A. **The Ecology of Sea Shores**. New York: CRC Press, p. 555, 2000.

MCLACHLAN, A. Sandy beach ecology- a review. In: MCLACHLAN, A.; ERASMUS, T. (Eds). **Sandy beaches as ecosystems**. Springer, Dordrecht, 1983. p. 321-380. 1983.

MCLACHLAN, A. Dissipative beaches and macrofauna communities on exposed intertidal sands. **Journal of coastal research**, p. 57-71, 1990.

MCLACHLAN, A.; BROWN, A.C. **The Ecology of Sandy Shores**. 2. ed. New York: Acad. Press, 2006. 373 p.

MONICO, J.F.G. **Posicionamento pelo GNSS – Descrição, Fundamentos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2008. 476 p.

MUEHE, D. Geomorfologia Costeira. In: GUERRA, A.J.T.; CUNHA S.B. (Org.). **Geomorfologia - uma atualização de bases e conceitos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Bertrand Brasil S.A., 1995, p. 270.

MUEHE, D. Estado morfodinâmico praias no instante da observação: uma alternativa de identificação. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 46, n. 2, p. 157–169, 1998.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021.

REGUERO, B.G.; MENÉNDEZ, M.; MÉNDEZ, F. J.; MÍNGUEZ, R.; LOSADA, I.J. A Global Ocean Wave (GOW) calibrated reanalysis from 1948 onwards. **Coastal Engineering**, v. 65, p. 38–55, 2012.

SALLENGER, J.R.; KRABILL, W.; BROCK, J.; SWIFT, R.; MANIZADE, S.; STOCKDON, H. Sea-cliff erosion as a function of beach changes and extreme wave runup during the 1997–1998 El Niño. **Marine Geology**, v. 187, n. 3-4, p. 279-297, 2002.

SHORT, A. D.; WRIGHT, L. D. Morphodynamics of high energy beaches: an Australian perspective. **Coastal geomorphology in Australia**, p. 43-68, 1984.

STOCKDON, H.F.; HOLMAN, R.A.; HOWD, P.A.; SALLANGER, A.H.J. **Empirical parameterization of setup, swash, and runup**. **Coastal Engineering**, v. 53, p. 573–588, 2006.

THIELER, E.R.; HIMMELSTOSS, E.A.; ZICHICHI, J.L.; ERGUL, A. **The Digital Shoreline Analysis System (DSAS) version 4.0-an ArcGIS extension for calculating shoreline change**. US Geological Survey, 2009.

TOLMAN, H.L. User manual and system documentation of WAVEWATCH III version 3.14. **Technical note, MMAB Contribution**, v. 276, p. 220, 2009.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. **Method 3015A:** MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF AQUEOUS SAMPLES AND EXTRACTS. United States, 2007.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. **Method 3051A:** MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS. United States, 2007.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. **Method 3052:** MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. United States, 1996.

VANOSMAEL, C.; WILLEMS, K.; CLAEYS, D.; VINCX, M.; HEIP, C. H. R. Macrobenthos of a Sublittoral Sandbank in the Southern Bight of the North Sea. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 62., p. 521 – 534, 1982.

WARTON, D.I.; LYONS, M.; STOKLOSA, J.; IVES, A. Three points to consider when choosing LM or GLM test for count data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 882-890, 2016.

WESTHEIDE, W. **Polychaetes: Interstitial families**. 2. ed. Shrewsbury: Field Studies Council, 2008, 169 p

RESTINGA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Diolina Moura Silva (coord)	Coordenador de tema, Gestão da tomada de dados ecofisiológicos em campo, gestão das análises de laboratórios e sob cultivo protegido. Avaliações da produção primária e do sistema antioxidante. Divulgação científica.	UFES
Valquíria Ferreira Dutra	Inventário taxonômico da vegetação afetada; Identificação do material vegetal; Taxonomia de fanerógamas; Avaliação da distribuição florística; Depósito em acervo de herbários.	UFES
Silvia Tamie Matsumoto	Impacto cito-genético, florístico e fitossociológico; Efeitos ecotoxicológicos na dinâmica da vegetação.	UFES
Andréa Moura Bittencourt	Microbiota do solo (biocontrole e promotores de crescimento).	UFPeI
Marcos Antonio Bacarin	Trocas gasosas; Fluorescência transiente da clorofila a	UFPeI
Adriano Nunes-Nesi	Componentes primários; Produção de biomassa; Perfil metabólico da comunidade vegetal	UFV
Wagner Luiz Araújo	Compostos primários e secundários; Sistemas anti-oxidantes; Perfil metabólico da comunidade vegetal.	UFV
Oberdan José Pereira (Pós-doc)	Profissional com notório saber em Restinga, responsável pela avaliação da distribuição florística e fitossociológica; Inventário da estrutura vegetal das áreas amostrais.	UFES
Sabrina Garcia Broetto (Pós-doc)	Apoio a coordenação da Restinga. Profissional com doutorado responsável pelo banco de dados da Restinga. Acompanhamento das análises e registros de dados de perfil molecular, organização das planilhas e tratamento dos dados.	UFES
Mariela Mattos da Silva (Pós-doc)	Apoio a coordenação da Restinga. Profissional com doutorado responsável pela gestão financeira. Acompanhamento das análises e registros de dados de sistema antioxidantes, organização das planilhas e tratamento dos dados.	UFES
Thaís Araujo dos Santos Gasparini (Pós-doc)	Profissional com doutorado, responsável pelas atividades de campo. Monitoramento da capacidade de recuperação sob cultivo protegido.	UFES
Rodrigo Theofilo Valadares (Pós-doc)	Profissional com doutorado, responsável pelas atividades de campo. Florística, taxonomia e morfometria geométrica. Identificação de material botânico, análise dos dados, elaboração de relatórios.	UFES
Auxiliadora Oliveira Martins (Pós-doc)	Profissional com doutorado, responsável pelo perfil metabólico da comunidade vegetal	UFV
Vanessa Nogueira Soares (Pós-doc)	Profissional com doutorado, responsável pela análise da microbiota do solo (biocontrole e promotores de crescimento); germinação e estabelecimento das plântulas.	UFPeI
Mestre/ Profissional Pleno I	Profissional com título de Mestre entre 2 e 5 anos; Enquadramento Profissional Pleno I - Pesquisador em biologia vegetal, com experiência na área, para realizar atividades de pesquisa, coletar, tratar e analisar material biológico, dados e informações.	UFES
Mestre/ Profissional Pleno I	Profissional com título de Mestre entre 2 e 5 anos. Pesquisador em biologia vegetal, com experiência na área. Acompanhamento das análises e registros de dados da Restinga, confecção das planilhas e tratamento dos dados.	UFES
DCTI - Mestrado	Processamento e Gestão do Banco de dados da Restinga	UFES
DCTI - Doutorando* (DCTI)	Acompanhamento das análises e registros de dados do Perfil Metabólico, organização das planilhas e tratamento dos dados	UFV

DCTI - Doutorando* (DCTI)	Profissional especializado para análises de dados no campo. Inventário da estrutura vegetal das áreas amostrais; Avaliação da distribuição florística e fitossociológica	UFES
DCTI - Doutorando* (DCTI)	Apoio nas análises ecofisiológicas. Análise de trocas gasosas e fluorescência da clorofila; Auxílio nas análises de cultivo protegido.	UFES
DCTI - Doutorando* (DCTI)	Profissional especializado para cultivo protegido. Análises da capacidade de recuperação das espécies e análises ecofisiológicas.	UFES
Iniciação Científica	Apoio na identificação de causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação sob condições de campo. Apoio técnico das análises e registros de dados na área experimental.	UFES
Iniciação Científica	Apoio técnico na determinação das respostas antioxidantes. Apoio na identificação de causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação da vegetação da restinga.	UFES
Iniciação Científica	Organização, identificação, catalogação e incorporação de espécimes nas coleções botânicas.	UFES
Iniciação Científica	Aluno para auxiliar na coleta de material em campo, na análise e processamento de dados no Herbário VIES.	UFES
Iniciação Científica	Apoio técnico nas análises e registros de dados de citogenética. Apoio na identificação de efeitos da contaminação sob a biologia vegetativa e reprodutiva da vegetação	UFES
Iniciação Científica	Apoio e acompanhamento das análises e registros de dados da Microbiota do Solo, organização de planilhas e tratamento dos dados	UFPeI

2. ESCOPO

O monitoramento inicial das restingas, realizado desde 2018, permitiu sugerir indicadores biológicos, ainda não mensurados. Esses indicadores são bem representativos e possuem maior correlação com o aporte de metais ao longo da vegetação do litoral do Espírito Santo. Os resultados permitiram identificar áreas com maiores interferências e mostram as consequências da presença dos contaminantes veiculados (mar-continente) pelo spray marinho, por momentos de inundação na restinga, intensificadas durante eventos extremos e de mudança do sentido e da intensidade do vento e da vazão do Rio Doce. A continuidade do monitoramento permitirá evidenciar os impactos dos elementos traços sobre a produtividade primária e capacidade reprodutiva da restinga, visto que podem não apenas influenciar a aptidão das comunidades em se recuperar do impacto, mas também originar efeitos na contaminação de agentes polinizadores e dispersores e na sobrevivência em longo prazo. Uma vez compreendida a necessidade de monitoramento florístico e estrutural, superficial e subterrâneo, em diferentes fitofisionomias da restinga pretende-se: Validar o monitoramento ecofisiológico *in situ* por meio de biotestes e cultivo controlado e fornecer subsídios aplicáveis em Programas de Recuperação de Área Degradada. A realização de bioensaios reveste-se de importância num cenário onde há limitados dados pretéritos, variações geomorfológicas e estruturais que inviabilizam a comparação com sítios sugeridos como controles para a área estudada.

3. OBJETIVO

Monitorar os efeitos do impacto da contaminação da vegetação de Restinga, resultantes do aporte de rejeitos de mineração, visando fornecer subsídios para recuperar e conservar a biota atingida.

3.1 Objetivos específicos

- Analisar de forma integrada a dinâmica espaço-temporal dos componentes abióticos e bióticos do ecossistema Restinga frente aos possíveis processos de influência sobre os impactos decorrentes do aporte de rejeito de mineração oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG);
- Validar os impactos identificados e evidenciados durante o monitoramento inicial do PMBA, decorrentes do rompimento da barragem de Fundão sobre a vegetação da restinga;
- Monitorar *in situ* e *ex situ* a capacidade de recuperação da vegetação atingida;
- Fornecer subsídios para serem usados no processo de recuperação da biota atingida.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Efeitos da contaminação do ecossistema restinga

Justificativa da Meta 1:

Por estar sobre um sedimento pobre em nutrientes, o ecossistema Restinga é diretamente dependente da oferta de elementos minerais via aerossol marinho (“spray” marinho) os quais também são depositados sobre a vegetação e justificam a necessidade do monitoramento de seus componentes abióticos. Para a biota, junto às avaliações dos tecidos foliares pretende-se avaliar órgãos reprodutivos e recompensas florais de espécies selecionadas, cujos resultados poderão corroborar tendências observadas, bem como prever o impacto potencial nas cadeias tróficas.

A restinga associada à foz do Rio Doce é uma região reconhecida como prioritária para a conservação e que enfrenta déficit de conhecimento sobre as fenofases das espécies regionais. A esta lacuna também inclui possíveis influências que o rejeito poderia causar sobre estas fenofases. Continuar monitorando essas áreas é fundamental para entender se as alterações ambientais estão causando danos às populações destas espécies, além de subsidiar futuros estudos, no que se refere a estrutura da comunidade vegetal.

Para o cumprimento desta meta serão utilizados biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares com o objetivo de medir os efeitos dos contaminantes nos organismos e potencialmente nos ecossistemas. Dessa forma é possível entender a manifestação dos efeitos adversos antes que qualquer alteração visível possa ser notada, a fim estimar suas consequências para a produtividade primária e capacidade reprodutiva da comunidade vegetal da restinga.

META 2 – Caracterização e discriminação espectral das fitofisionomias de restinga utilizando sensoriamento remoto

Justificativa da Meta 2:

Pretende-se avaliar as correlações entre índices espectrais e parâmetros fitossociológicos, florísticos e ecofisiológicos obtidos durante o monitoramento do PMBA utilizando técnicas de SIG e SR. Os dados obtidos das séries temporais para o cálculo dos índices de vegetação serão comparados aos parâmetros de produtividade primária obtidos *in situ*.

Dados oriundos de geoprocessamento de imagens podem servir como um comparativo potencial, principalmente envolvendo o período de senescência das comunidades arbustivas e arbóreas. Os resultados permitirão levantar a riqueza regional, bem como definir a escala temporal a ser avaliada durante o monitoramento fenológico da vegetação.

META 3 – Respostas da vegetação à contaminação por elementos minerais

Justificativa da Meta 3:

O diagnóstico inicial e monitoramento no âmbito do PMBA se confirmou como determinante no delineamento dos possíveis impactos à restinga afetada pela pluma de mineração. Entretanto, torna-se necessária a validação dos resultados obtidos em campo, a fim de isolar padrões de respostas da vegetação frente à presença dos metais, visto a grande variabilidade de condições ambientais à que plantas da Restinga estão sujeitas. O uso de biotestes com o extrato solubilizado do solo coletado nas próprias estações amostrais apresenta benefícios como a manutenção das condições e proporções entre os metais simulando a condição de campo, e somados a avaliação da dose-resposta de metais permitirá o estudo das relações entre os elementos minerais e da análise dos efeitos combinados destes sobre as respostas de indicadores já monitorados *in situ*.

Os primeiros estudos, realizados ao longo de três anos do projeto, permitiram isolar bactérias de solo rizosférico e de tecidos radiculares de espécies vegetais de restinga produtoras de compostos quelantes. Pretende-se com essa meta selecionar algumas espécies bacterianas para serem utilizadas no tratamento para estimular a germinação das sementes, estabelecimento das mudas, crescimento e desenvolvimento das plantas, produção de sementes, fitoextração e fitoacumulação de metais e de resistência a estresses abióticos.

Portanto esta etapa busca não apenas confirmar os resultados obtidos *in situ*, mas também avaliar a capacidade de recuperação da vegetação da Restinga impactada, indicando espécies vegetais mais propícias para uso em ações de recuperação, que poderão ser usadas como estratégias de conscientização e divulgação da importância da vegetação de restinga e sua conservação para comunidade local.

5. PRODUTOS

DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Identificação das espécies Inventário taxonômico; Registro fotográfico; Amostras de material dissecado depositados em herbário para identificação botânica e avaliação do status de conservação.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira
Dados estruturais da vegetação; Quantificação de área basal; Dados de frequência absoluta e relativa; Banco de dados específico das formações vegetais sob análise	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira
Dados de sensoriamento remoto; Índices de vegetação: EVI - <i>Enhanced Vegetation Index</i> ; NDVI - <i>Normalized Difference Vegetation Index</i> ; PRI - <i>Photochemical Reflectance Index</i> ; CO ₂ Flux; Dados de uso e cobertura da terra; Dados de fenofases da vegetação, atuais e pretéritos.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira Diolina Moura Silva
Dados de eficiência de propagação vegetativa e reprodutiva; Determinação da eficiência de germinação e crescimento vegetativo em condições controladas; Identificação dos promotores na microbiota do solo	Diolina Moura Silva Andrea M Bittencourt Sílvia Tamie Matsumoto
Dados de granulometria do solo; Dados de concentração de elementos químicos dos solos; Dados de concentração de elementos químicos nos tecidos vegetais.	Diolina Moura Silva Jaqueline Albino Maria Tereza W. D. Carneiro Lima
Dados da Fotossíntese líquida Transpiração Eficiência de carboxilação Eficiência do uso da água Eficiência fotoquímica do fotossistema II; Eficiência fotoquímica do fotossistema I; Fotoinibição; Teores de clorofila e antocianinas nas folhas e frutos avaliados.	Diolina Moura Silva Marcos Antonio Bacarin
Dados de componentes dos sistemas antioxidantes e dados de expressão de genes de resposta à presença de metais.	Diolina Moura Silva Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo
Concentração dos principais compostos primários e secundários do metabolismo vegetal.	Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo

ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 23º mês de vigência do Projeto)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Análise e processamento dos dados que constituirão o inventário florístico, estrutural da comunidade da Restinga. Análise e processamento dos dados que constituirão a fenologia de espécies da Restinga.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira
Análise, identificação e processamento do registro fotográfico.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira
Identificação das espécies; Envio a especialistas; Envio das exsiccatas para os acervos dos Herbários.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira
Avaliação do grau de ameaça das espécies ocorrentes nas áreas inventariadas.	Valquíria Ferreira Dutra
Listagem de espécies chave para recuperação ambiental de formações vegetais específicas.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira Diolina Moura Silva
Avaliação da fenologia regional por seleção de imagens de satélite Identificação dos padrões das fenofases da vegetação entre estações amostrais em relação a dados pretéritos. Inter-comparação de parâmetros de produtividade primária e uso e cobertura da terra em áreas de restinga via sensoriamento remoto.	Valquiria F. Dutra Oberdan José Pereira Diolina Moura Silva

Identificação de causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies da restinga sob condições controladas.	Diolina Moura Silva Andrea M Bittencourt Sílvia Tamie Matsumoto
Análise e processamento dos dados sedimentológicos.	Diolina Moura Silva
Análise e processamento de dados da microbiota do solo.	Andrea M Bittencourt
Cálculos e confecção de planilhas contendo teores de metais e semi-metals nos tecidos vegetais.	Diolina Moura Silva
Processamento, análise e interpretações dos dados das trocas gasosas, fluorescência de clorofila e pigmentos foliares.	Diolina Moura Silva Marcos Bacarin
Cálculos e confecção de planilhas dos componentes do sistema antioxidante e expressão de genes de resposta à presença de metais.	Diolina Moura Silva Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo
Cálculos e confecção de planilhas contendo teores dos pigmentos, carboidratos, componentes estruturais e outros componentes do metabolismo primário e secundário.	Diolina Moura Silva Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo
Análises multivariadas de aspectos transversais para integração de fatores abióticos e bióticos de influência sobre o ecossistema da restinga e ambiente costeiro.	Diolina Moura Silva Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

Serão avaliadas sete estações amostrais. Houve inserção de uma estação amostral (Degredo/Linhares), que irá possibilitar maior alinhamento entre a malha amostral do Ambiente Costeiro e três estações (uma da APA Conceição da Barra, Pontal do Ipiranga e uma em Regência) foram excluídas (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre as malhas amostrais atuais do PMBA e a nova proposta para o Ambiente Costeiro, tema Restinga.

Código	Ambiente/Município	Situação
E1	APA Conceição da Barra, Conceição da Barra	Permaneça
E3	Aldeia do Coco, São Mateus	Permaneça
E4	Barra Nova, São Mateus	Permaneça
E6	Cacimbas, Linhares	Permaneça
	Degredo, Linhares	Incluir
E7	Regência – Tamar, Linhares	Permaneça
E9	Mar Azul, Aracruz	Permaneça

O monitoramento in situ do estado de conservação, a caracterização e discriminação espectral por sensoriamento remoto e a avaliação das respostas de espécies vegetais à contaminação por elementos minerais da Restinga estão resumidos na Tabela 3.

Seis espécies focais das três formações vegetais (herbácea, arbustiva e arbórea) serão monitoradas quanto a variação espaço-temporal dos aspectos de produtividade primária, reprodução e capacidade de recuperação da comunidade vegetal.

Espécies-chave também serão avaliadas. A escolha será baseada na importância ecológica ou econômica (por exemplo: aquelas de importância para as comunidades do entorno).

Tabela 3: Frequência amostral para a nova proposta para o Ambiente Costeiro, tema Restinga.

META	Análises a serem realizadas	Frequência
Meta 1	Fitossociologia: Dinâmica das fitofisionomias	Anual
Meta 1	Contaminação ambiental e da vegetação da Restinga	Semestral
Meta 1	Ecofisiologia: Danos bioquímicos, estruturais e celulares	Semestral
Meta 1	Fenologia de estruturas vegetativas e reprodutivas	Trimestral
Meta 1	Ecofisiologia: Produtividade primária (Fotossíntese)	Trimestral
Meta 2	Sensoriamento remoto	Contínua
Meta 3	Cultivo protegido: Identificação de causa-efeito e microbiota do solo	Contínua

6.2. Meta 1 - Efeitos da contaminação do ecossistema restinga

6.2.1. Determinação de contaminantes em solo, aerossol marinho e tecidos vegetais

Coleta de solo: as amostras de solo serão coletadas semestralmente, respeitando a periodicidade estabelecida pelo monitoramento (período seco/chuvoso). A abrangência incluirá as três formações vegetais amostradas em cada estação. O critério de escolha incluirá 10 pontos de coleta estabelecidos próximos às plantas monitoradas pelos estudos ecofisiológicos. Serão coletadas amostras com 20 cm de profundidade, suficiente para análise em triplicata. As amostras serão secas em estufa a 60°C por 72 h ou até peso constante.

Coleta de aerossol marinho: as coletas serão realizadas nas estações amostrais definidas em função do posicionamento na compartimentação e morfodinâmica de região costeira do Espírito Santo. Folhas das espécies selecionadas nestas estações e ocorrentes nas três formações vegetais serão lavadas com 50 mL de água ultrapura e o líquido recolhido em tubos Falcon 50 mL, com adição de HNO₃ a 2% (v/v) para conservação. Após a lavagem, a área foliar individual de cada folha também será determinada usando medidor de área foliar portátil (AM350, ADC BioScientific Ltd., England). As amostras serão mantidas sob refrigeração até o envio para as análises químicas (Laboratório de Espectrometria Atômica/UFES).

Coleta de estruturas vegetativas e reprodutivas: espécies-chave selecionadas nas estações amostrais serão analisadas, compatíveis com a análise de aerossol marinho, com tratamentos compostos por cinco indivíduos. As espécies escolhidas deverão estar entre as espécies com maior valor de

importância, relacionadas previamente pelos estudos fitossociológicos e que melhor representam as comunidades de cada estação. Os órgãos coletados de um mesmo indivíduo agrupados para obtenção de material suficiente para análise em triplicata. Amostras de folhas completamente expandidas e órgãos reprodutivos (pistilo, estames, frutos e/ou sementes) serão coletadas e secas em estufa a 60°C por 72 h ou até peso constante.

Coleta de recompensas florais (néctar e pólen): análises da contaminação das recompensas florais serão realizadas em amostras de espécies inventariadas nas estações amostrais da Restinga, bem como amostras do mel produzido em regiões de entorno visando investigar possíveis contaminações da flora e fauna associada ao ecossistema estudado. A análise do néctar deverá levar em conta as características fenológicas obtidas no histórico de dados fenológicos. O critério de escolha das espécies deverá levar em conta a capacidade de produção de néctar em quantidade mínima necessária para análise. O néctar será coletado com auxílio de micropipeta e armazenado em tubo Eppendorf para análises posteriores. Pelo menos cinco amostras de mel de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) serão adquiridos diretamente com a associação de apicultores de Degredo/Linhares e de Meleiras/Conceição da Barra. O critério de escolha das localidades seguirá (i) pontos de amostragem do spray marinho, (ii) o posicionamento ao longo dos compartimentos da costa capixaba e (iii) a presença de associações de apicultura contendo produção associada com a vegetação de restinga próxima às estações avaliadas.

Análise dos elementos químicos: as análises das amostras de pistilo, antera, pólen e néctar, bem como de mel serão realizadas conforme proposto por Xun et al. (2017) e Silveira-Junior et al. (2020). A quantificação analítica será realizada pelo Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (LEA/UFES) para análise química do solo e tecido vegetal, nos quais serão determinados os elementos traço (U.S.EPA 3051A, 2007), bem como a granulometria no solo por meio de peneiramento a seco. A quantificação de elementos-traço (fração total) nas amostras de aerossol marinho seguirá o método EPA 3015a para água.

Análise polínica: Amostras de pólen serão coletadas antes da antese e espalhadas em placas de Petri contendo solução de sacarose e ácido bórico em diferentes concentrações. As placas serão observadas em diferentes intervalos de tempo seguindo o método de Shivanna e Rangaswamy (1993) ou Dafni et al. (2005). Serão considerados germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico exceda o dobro do seu próprio diâmetro. Esse experimento será realizado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri, e cada repetição cinco campos de visão. Somados a isso, o inventário polínico das amostras do mel de abelha também será realizado a fim de determinar a origem floral e presença de pólen das espécies mais frequentes encontradas nas estações amostrais de acordo com cada localidade de produção. Para isso as amostras serão tratadas quimicamente segundo protocolos anteriormente descritos (LOUVEAUX et al., 1978; JONES e BRYANT, 2004) e após acetólise (ERDTMAN, 1960), o material será montado em lâminas com gelatina glicerizada. O inventário polínico seguirá o protocolo de Moar (1985). Os tipos de pólen identificados serão classificados de acordo com a frequência de classes propostas por Louveaux et al. (1978): pólen predominante (> 45%), pólen secundário (15-45%), pólen

importante (3-15%), pólen menor (1-3%) e vestígios pólen (<1%). A identificação dos tipos de pólen será realizada por comparações com lâminas da coleção (palinoteca) do Museu Nacional do Rio de Janeiro.

O acúmulo de elementos minerais nos órgãos e recompensas florais e, a análise polínica serão analisados por meio de ANOVA, considerando cada elemento separadamente.

6.2.2. Fenologia da vegetação

A coleta de dados fenológicos será realizada trimestralmente, juntamente com as coletas para o estudo florístico. A avaliação incluirá cinco indivíduos georreferenciados das espécies avaliadas nos estudos ecofisiológicos, bem como espécies com alto valor de importância definidas pelos estudos fitossociológicos. Observações complementares em indivíduos não marcados serão realizadas em cada comunidade, a fim de melhorar a interpretação dos dados e capturar efeitos isolados (e.g. fitossanidade). Cada estágio fenológico será registrado com câmera fotográfica.

Serão tomados dados fenológicos vegetativos e reprodutivos avaliados sob critérios coerentes com a bibliografia (MORELLATO et al. 1989). O período de brotamento (i) será definido como aquele que se inicia com o aparecimento de pequenas folhas membráceas, brilhantes e com coloração verde clara, alaranjada, amarelada ou avermelhada. A caducifolia (ii) é definida como o período com queda de folhas perceptível pela presença de ramos nus ou copas parcialmente falhadas, folhas com coloração amarronzada e enroladas e finalmente, a presença de folhas da espécie acumuladas sob a árvore. A floração é definida como aquela em que as flores estavam com botões ou abertas (antese), sendo o período de frutificação aquele em que os frutos estão totalmente formados, maduros e prontos para a dispersão.

Os dados obtidos pelas avaliações *in loco* serão planilhados em Microsoft Excel. Serão calculadas as médias e desvios-padrão de cada fenofase dentro de cada estação. A média obtida servirá como parâmetro a ser comparado com dados climáticos (precipitação, temperatura e comprimento do dia), ecofisiológicos e fitossociológicos.

Dessa forma busca-se: a) Avaliar e relacionar as fenofases das espécies-chave nas fitofisionomias de restinga presentes nas estações amostrais; b) Determinar a síndrome de dispersão das espécies-chave; c) Quantificar o percentual de espécies zoocóricas encontrada em cada fitofisionomia analisada; d) Elaborar uma lista de espécies zoocóricas destinadas a Programas de Recuperação de Área Degradada em Restinga; e) Correlacionar os dados fenológicos com os parâmetros fitossociológicos e ecofisiológicos já obtidos no âmbito do PMBA.

6.2.3. Dinâmica das fitofisionomias de restinga impactados

A continuidade do monitoramento das estações amostrais da Restinga reveste-se de extrema importância para a validação dos possíveis indicadores de impacto do rejeito de Mariana/MG via salsugem. Em cada estação amostral (exceto Estação 9) será feito o acompanhamento da dinâmica da vegetação herbácea, nos meses abrangendo a estação chuvosa. A ausência de uma comparação na estação seca é justificada pelos resultados obtidos no Ano 1, que demonstraram não haver mudanças

estruturais expressivas entre os dois períodos. A avaliação desta comunidade será feita com finalidade de se entender se há variação nos padrões de cobertura e riqueza das espécies de acordo com o distanciamento da Foz do Rio do Doce, bem como com os processos erosivos oriundos dos dados de praias. A Estação 9 – Mar Azul, no município de Aracruz, não será analisada sob o aspecto de sua estrutura, por ser pouco desenvolvida e sofrer constante perda de cobertura vegetal devido aos processos erosivos típicos desta região da costa capixaba.

Para o levantamento da estrutura da comunidade da formação herbácea será utilizado o método de parcelas de 1 x 1 m (MUELLER-DOMBOIS e ELLENBERG, 1974) para obtenção dos dados fitossociológicos. As parcelas serão distribuídas em 10 linhas perpendiculares a linha de costa, com uma distância de 50 m entre elas, a partir das primeiras plantas junto ao mar, com comprimento variável, na dependência do comprimento desta formação até a formação arbustiva não inundável, mas que não deverá ultrapassar os 50 metros de comprimento. Assim, caso esta medida seja possível de utilizar, serão analisadas 25 parcelas por linha amostral, totalizando 250 m² por estação amostral.

Todos os indivíduos de qualquer forma biológica, dentro do critério de inclusão, serão amostrados. Os dados a serem tomados em cada parcela serão (i) Frequência, utilizando como critério de inclusão amostral indivíduos enraizados no interior da parcela ou aqueles que apresentarem parte do corpo vegetal acima do substrato no interior da parcela; (ii) Cobertura, obtida por estimativa visual, considerando o percentual de cobertura que cada espécie ocupa na área amostral, utilizando a parcela (1 m²), dividida em partes até o limite mínimo de 0,0625 m² (6%), neste caso, objetivando auxiliar nesta estimativa, também serão estimados os percentuais de área nua e área de detritos.

No levantamento da estrutura da vegetação na formação arbustiva será utilizado o método de intercepto de linha (MUELLER-DOMBOIS e ELLENBERG 1974). A coleta de dados será executada anualmente, tendo em vista que a captação de possíveis mudanças estruturais não exige coletas semestrais. Serão demarcadas sete linhas (orientadas por bússola) por toda extensão da vegetação, no sentido mar – continente, com uma distância de 50 m entre elas. Os indivíduos lenhosos e herbáceos com altura igual ou superior a 50 cm que interceptarem as linhas serão incluídos na amostragem. Para cada indivíduo serão tomadas: a extensão do indivíduo interceptado pela projeção da linha e sua altura. Lianas e herbáceas menores que 50 cm serão incluídos apenas como presença.

A estrutura da vegetação na formação arbórea será avaliada segundo metodologia sugerida por Gentry (1991), sumarizado por Phillips e Miller (2002) e enquadrado no Programa de Amostragem Rápida (HIGGINS e RUOKOLAINEN 2004). Tal metodologia é considerada eficiente para a estimativa da diversidade, pois inclui plantas jovens, árvores, arbustos, trepadeiras e hemiepífitas que geralmente não são amostradas em parcelas de árvores (CLINEBELL et al. 1995). A amostragem será realizada anualmente e através de três transectos fixos de 2 x 50 m, totalizando 0,03 ha, estabelecidos perpendicularmente a uma linha base, distantes 50 m entre si, e 50 m da borda da floresta, para minimizar o efeito de borda e evitar a sobreposição de áreas amostradas. A amostragem será realizada em duas faixas de 1 m ao longo de cada linha mestra (50m) orientada com bússola. Nos transectos serão incluídos todos os indivíduos com DAP (Diâmetro à Altura do Peito) igual ou superior a 2,54 cm. A altura de cada indivíduo será estimada visualmente, tomada com o auxílio de um podão com cabo

telescópico (10m), sempre pelo mesmo membro da equipe. Os indivíduos mortos também serão amostrados. Os indivíduos perfilhados acima do solo e abaixo da altura do peito (1,30 m) serão incluídos quando um dos seus ramos obedecer ao critério de inclusão, sendo anotado o CAP (Circunferência à Altura do Peito) de todas as ramificações para o cálculo da área basal. A periodicidade anual de coleta se justifica em função da exigência de intervalos maiores para captação de possíveis mudanças estruturais.

Para as três formações, serão calculados os parâmetros de frequência absoluta (FA), frequência relativa (FR), dominância absoluta (DoA), dominância relativa (DoR) e valor de importância (VI) de cada espécie encontrada (BROWER e ZAR 1984). O parâmetro Densidade não será computado para a formação herbácea, em função da existência de espécies com hábitos cespitosos, reptantes e rizomatosos, impossibilitando de maneira prática a identificação do que é um indivíduo. Os índices de Densidade Linear e Cobertura Linear são resultantes do número de indivíduos amostrados (N) e intercepto total (L), respectivamente, divididos pelo tamanho da amostragem (1000 m), sendo seus valores proporcionais e, portanto, desnecessários e suprimidos. O parâmetro de Frequência Absoluta (FA) refere-se à porcentagem de ocorrência da espécie na unidade amostral e o Valor de Importância (VI) é resultante da somatória dos valores relativos de Frequência Relativa e Dominância Relativa para a formação herbácea e Densidade Linear, Cobertura Linear e Frequência para a formação arbustiva e florestal. Será calculado o Índice de Diversidade de Shannon-Weaver e para análise de similaridade florística, será utilizado o Índice de Sørensen (MÜELLER-DOMBOIS e ELLENBERG, 1974).

6.2.4. Monitoramento ecofisiológico da vegetação de restinga

Para a continuidade do monitoramento das respostas ecofisiológicas da vegetação da restinga, cinco indivíduos de cada espécie de interesse serão avaliados trimestralmente *in situ* nos polígonos amostrais já monitorados das três formações vegetais quanto a produtividade primária por meio da análise da Cinética de Emissão da Fluorescência Rápida (STRASSER et al., 2010, LI et al., 2014, BACARIN et al., 2016, CHEN et al., 2016, KALAJI et al., 2016), utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norkfolk, UK). Somados a isso, as trocas gasosas serão estimadas utilizando-se um analisador de gás no infravermelho, portátil, (IRGA, modelo LCI SD, ADC BioScientific Ltd., England). Nestas mesmas folhas, será aferido o teor relativo de clorofila com o uso de um clorofilômetro portátil (SPAD-502, Konica Minolta Optics, Inc.) e expresso como índice SPAD (FARIA-SILVA, 2017).

Para as análises laboratoriais, amostras vegetais (folhas maduras e totalmente expandidas, frutos, sementes e/ou amostras de raízes), serão coletadas semestralmente com tratamentos compostos por cinco indivíduos, congeladas em nitrogênio líquido (N₂) e armazenadas em laboratório a temperatura de -80°C. Após a trituração das amostras em N₂, as extrações serão realizadas em meio de extração apropriado.

Para as análises de metabólitos primários, os conteúdos de clorofila serão extraídos conforme previamente descrito (LISEC et al., 2006) e determinados por espectrometria (WELLBURN, 1994). Os níveis de amido, sacarose, glicose e frutose serão determinados segundo Fernie et al. (2001). Malato

e prolina serão determinados como descrito por Nunes-Nesi et al. (2007) e Carillo e Gibon (2011), respectivamente. Proteínas e aminoácidos serão avaliados conforme descrito previamente por Bradford (1976) e Yemn e Cocking (1955). Para determinar possíveis mecanismos de respostas à metais, o conteúdo de metalotioneína será determinado segundo Viarengo et al., (1997) com modificações.

Para a avaliação das respostas do sistema antioxidante, os teores de ascorbato e dehidroascorbato serão determinados conforme previamente descrito por Kampfenkel et al., (1995). Somados a isso, o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (GSH + GSSG) será determinado de acordo com Griffith (1980). Serão determinadas as atividades de enzimas do sistema antioxidante: dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidase ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e redutase da glutathiona (GR; EC 1.8.1.7), conforme descrito em Lima et al. (2002) e Pinheiro et al. (2004). Também serão determinados a extensão de danos celulares, determinada pela quantificação de aldeído malônico (Malondialdeído - MDA) via substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Cakmak e Host (1991) e Lima et al. (2002), com modificações.

No diagnóstico molecular, sequências de outras espécies serão utilizadas como elementos de 'investigação' do acervo (ALTSCHUL et al., 1990), para identificar as regiões candidatas a genes de interesse. Essas regiões serão analisadas com a ferramenta 'BMC Search Launcher' disponível no servidor do ExPASy (Expert Protein Analysis System) do Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). As sequências de aminoácidos deduzidas das ORFs serão comparadas por meio da ferramenta "ClustalW" (THOMPSON et al., 1994), disponível em <http://align.genome.jp/>. A análise da expressão dos genes por qPCR (em triplicata de experimento), utilizando o kit 'Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG' (Invitrogen) e o termociclador 'Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

Visando avaliar as alterações no ciclo celular: células binucleadas, células com micronúcleo, c-metáfase, pontes e aderência cromossômicas e quebras, provocados pela acúmulo de metais, meristemas das radículas de espécies selecionadas serão fixados em Carnoy (3:1) por 24 horas em temperatura ambiente e utilizadas para confecção das lâminas. Os meristemas serão submetidos a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C e coloridas pela reação de Feulgen.

6.2.5. Caracterização de aspectos transversais entre a dinâmica marinha, morfologia das praias e distribuição de elementos dispersos e/ou depositados sobre a vegetação da restinga

No ambiente restinga, a disponibilidade dos elementos minerais que potencialmente alcançaram a vegetação na extensão de suas três formações depende diretamente de fatores como os eventos de inundação, que são limitados em sua maioria às formações mais próximas à praia e acontecem somente quando as condições, principalmente morfodinâmicas, são favoráveis. Somado a isso, a presença dessa vegetação na área costeira é decorrente de sua exposição ao aerossol marinho ("spray" marinho), principal fonte de nutrientes nestas plantas (BOYD e ELLWOOD, 2010), que sob a ação dos ventos na superfície do mar transportam no sentido mar-continente, em suspensão, gotículas da solução salina (POLJAKOFF-MAYBER e GALE, 1975) e material particulado nele diluído. Para ambos os fatores, a qualidade da água do ambiente marinho contribui para a presença do material

sobre as restingas, e está associada a dois principais processos físicos: a vazão do Rio Doce e a ressuspensão/remobilização do fundo marinho provocada por ondas de gravidade, que disponibiliza na coluna d'água material depositado no fundo durante períodos menos turbulentos, e que são posteriormente dispersos pela ação das marés e ventos.

Dados de componentes bióticos e abióticos do monitoramento *in situ* da restinga serão confrontados com dados abióticos obtidos para os ecossistemas marinho e praial, bem como dados pretéritos (quando disponíveis) por meio de análises multivariadas, a fim de avaliar como a morfodinâmica marinha e praial contribuem para as pressões que determinarão a frequência e intensidade dos distúrbios ocasionados pela contaminação na resiliência e/ou os impactos crônicos da comunidade vegetal da restinga e ambiente costeiro.

6.3. Meta 2 – Caracterização e discriminação espectral das fitofisionomias de restinga utilizando sensoriamento remoto

6.3.1. Avaliação da fenologia regional por seleção de imagens de satélite

Serão utilizadas imagens adquiridas na forma de produtos Landsat corrigidas para efeitos geométricos e atmosféricos, e disponibilizadas pelo Serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS, www.earthexplorer.org). Também serão utilizadas imagens MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer), uma combinação de 16 dias de imagens de reflectância de superfície, agregadas e disponibilizadas em intervalos de 8 dias. A seleção de cenas levará em consideração a cobertura de nuvens da série temporal disponível para as imagens Landsat, optando-se por trabalhar com as imagens da época seca do ano de 2015 até a estação correspondente do último ano do monitoramento. Esta época é definida como mais adequada por apresentar menor cobertura de nuvens e maior contraste na fenologia da vegetação no gradiente Leste-Oeste.

A avaliação da resposta fenológica incluirá o índice de vegetação de duas bandas Enhanced Vegetation Index 2 (EVI 2) (JIANG et al., 2008). Para a comparação dos valores, selecionaram-se três pontos em cada fitofisionomia reconhecida na região: arbustiva e arbórea. A escala impossibilita a análise da formação herbácea, que continuará sendo avaliada *in locu*.

6.3.2. Inter-comparação de parâmetros de produtividade primária e uso e cobertura da terra em áreas de restinga via sensoriamento remoto

A partir das imagens do satélite Sentinel e sensores da série Landsat (ZANZARINI et al., 2013) serão produzidos mapas de uso e cobertura da terra para as diferentes estações amostrais da restinga afetada, por meio de ferramentas de visualização de séries temporais, como a MODIS (FREITAS et al., 2011). Serão extraídos alguns índices de vegetação em séries temporais de imagens dos sistemas orbitais (NDVI - Normalized Difference Vegetation Index, PRI – Photochemical Reflectance Index e CO₂ Flux) e de cobertura da terra, para a correlação com os parâmetros fitossociológicos, florísticos e ecofisiológicos. O NDVI é um índice que se baseia nos fatores de reflectância bidirecionais de superfície nas bandas do infravermelho próximo (banda 2) e do vermelho (banda 1), sendo sensível à presença

de pigmentos fotossintéticos, enquanto o EVI, é baseado nos fatores de reflectância bidirecionais de superfície nas bandas do infravermelho próximo (banda 2), do vermelho (banda 1) e do azul (banda 3) e otimiza as condições de captura de informações em áreas com maior densidade de biomassa (RISSO et al., 2012). Por outro lado, o índice PRI, que expressa a relação entre as bandas do verde e azul, pode ser relacionado com a taxa fotossintética. O sequestro de carbono pela vegetação depende da integração desses dois índices (NDVI e PRI), que geram um novo índice: o CO₂ flux (RAHMAN et al., 2000). Estes resultados, obtidos da superfície terrestre ao longo do tempo, nos períodos pré e pós rompimento da Barragem de Fundão, auxiliarão na determinação do declínio dos ecossistemas analisados dentro dos últimos 50 anos, bem como na avaliação dos diferentes estágios de regeneração nas estações amostrais analisadas.

6.4. Meta 3 – Respostas de espécies vegetais À contaminação por elementos minerais

6.4.1. Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies da restinga

Para a validação dos resultados do monitoramento *in situ* da influência da contaminação do sobre o ecossistema Restinga e a capacidade de recuperação de suas espécies vegetais, ensaios sob condições controladas serão realizados com extratos solubilizados do solo das formações vegetais das estações amostrais monitoradas. Dessa forma, busca-se não apenas confirmar os resultados já obtidos, como também detectar espécies vegetais mais propícias para uso em ações de recuperação da restinga. Somados a isso, o solo utilizado para implantação das mudas será suplementado com concentrações crescentes de elementos minerais que serão testados isolados ou conjugados para investigar seus efeitos sobre o crescimento e a fisiologia das plantas, e identificação de possíveis espécies fitorremediadoras. O material vegetal desenvolvido sob essas condições poderá ser utilizado para: (1) quantificação da magnitude do impacto gerado pela presença dos metais e (2) análise da capacidade fitorremediadora das espécies implantadas.

Sementes, frutos e/ou estacas das espécies selecionadas serão coletados manualmente nas estações amostrais da Restinga, e em seguida levados ao Núcleo de Estudos da Fotossíntese (NEF) na Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Goiabeiras, Vitória, ES. Os frutos serão despolidos com auxílio de peneira, e as sementes desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (SILVA, 2017). As sementes serão embebidas em água a temperatura ambiente por 24 horas de acordo com metodologia proposta por Cunha (2005) e quando necessário, escarificadas mecanicamente (eliminação parcial do tegumento na região oposta ao hilo) (COSTA, 2013).

Para a obtenção do extrato solubilizado do solo, alíquotas de 15 g de amostra de solo seco coletados nas estações amostrais serão colocadas em frascos de 100 mL e adicionados 60 mL de água ultrapura e processadas segundo metodologia prévias (NBR 10006, 2004; NBR 10007, 2004 e POHREN, 2013). Amostras do extrato serão submetidas a avaliação da concentração de elementos traço.

As sementes serão cultivadas em areia lavada, sendo irrigadas diariamente, na área experimental do Setor de Botânica da Universidade Federal do Espírito Santo (campus Goiabeiras). Dez dias após o plantio, as plantas passarão a receber a cada dois dias 100 mL de extrato solubilizado de solo nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300% (cinco plantas para cada concentração) durante 45 dias.

Os dados obtidos da germinação, emergência, índice de velocidade de germinação serão avaliados (BORGHETTI e FERREIRA, 2004; VALIO e SCARP, 2001). Serão aplicados testes para medir a velocidade e intensidade das atividades metabólicas das sementes e suas respostas fisiológicas, testes que avaliam os danos aos sistemas biológicos/bioquímicos, e a correlação entre os testes de germinação, tetrazólio, condutividade elétrica e emergência/normalidade das plântulas.

A capacidade de resposta da vegetação por propagação vegetativa também será avaliada. Estacas de plantas da vegetação herbácea, arbustiva e arbórea de interesse serão cultivadas em potes de 5L. Após o período de estabelecimento, dependendo das particularidades fenológicas de cada espécie, as plantas serão submetidas aos tratamentos de extrato solubilizado do solo, como acima descrito, com no mínimo três plantas para cada concentração. Ao longo de dois meses, serão realizadas as coletas dos dados, sendo as respostas das diferentes espécies selecionadas avaliadas para a determinação da extensão dos experimentos.

Visto a alta correlação observada entre as variações espaço-temporal dos indicadores biológicos da vegetação da restinga e concentrações de metais, como manganês, zinco e cobre - presentes em altas concentrações nas áreas de restinga avaliadas, as espécies selecionadas em ensaios anteriores quanto a possível tolerância a metais ou potencial fitorremediador serão submetidas a ensaios de dose-resposta de concentrações crescentes do metal, sendo utilizada como base a solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnon (1950). A partir dos resultados obtidos, ensaios para a avaliação do efeito combinado de metais serão posteriormente realizados com a utilização de soluções nutritivas enriquecidas.

Em ambos os ensaios (Bioensaios com extratos solubilizados do solo e Avaliação da dose-resposta) serão determinadas a concentração de elementos traços no solo e tecido vegetais das espécies selecionadas, bem como a atividade fotossintética, por meio da fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e teores de pigmentos. Somados a isso, também serão realizadas análises de metabólitos primários, componentes do sistema antioxidante e avaliações ecotoxicológicas. As análises serão realizadas seguindo protocolos anteriormente descritos neste documento.

Adicionalmente, visando a seleção de espécies com potencial econômico e ecológico também serão quantificados compostos fenólicos e flavonoides totais (SEVERI, 2007). A Capacidade antioxidante total (AAT) será estimada pelo método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - FRAP) descrito por Benzie e Strain (1996) e/ou pelo método do sequestro do radical α, α -difênil- β -picrilhidrazila (DPPH), segundo Alves et al. (2010), de acordo com as espécies e tecidos vegetais analisados.

6.4.2. Avaliação da promoção do crescimento vegetal e capacidade de fitorremediadora de elementos minerais

Os resultados obtidos anteriormente permitiram a seleção de colônias de microorganismos, isolados de amostras de solo e raízes das estações amostrais, com características de interesse para fitorremediação. A continuidade dessa caracterização *in vitro* será avaliada quanto à habilidade de produzir compostos relacionados à promoção de crescimento: fixação de nitrogênio atmosférico, produção de fitohormônios, produção de ACC deaminases, solubilização de fosfatos, produção de enzimas como quitinases, glucanases conforme descrito por Catellan (1999) e produção de compostos voláteis capazes de alterar a arquitetura das raízes (SHARIFI e RYU, 2018).

Uma vez estabelecido o melhor conjunto de habilidades, será realizada a seleção das colônias de microorganismos que apresentarem a capacidade de colonizar o sistema radicular e ou tecidos internos das espécies de restinga que produzam sementes não recalcitrantes e que não apresentam dormência ou para as quais existam métodos eficientes de quebra de dormência.

Os tratamentos com colônias de microorganismos selecionadas serão introduzidos no período de germinação e estabelecimento das plântulas (REED e GLICK, 2005; MESA et al., 2015, LALLOO et al., 2007). Os experimentos serão realizados em casa de vegetação e determinados os parâmetros biométricos (percentual e velocidade de germinação de sementes/estabelecimento de mudas, altura, número de folhas, área foliar, diâmetro de caule, biomassa formada, etc.) e fotossintéticos (fluorescência da clorofila, teor de clorofila, etc.). As plantas serão cultivadas em mistura areia + solo, e submetidas à ensaios de dose-resposta de concentrações crescentes de metais, sendo avaliados também os teores finais de metais no solo, bem como aqueles presentes nos diferentes tecidos vegetais. Assim será possível avaliar o efeito de bactérias promotoras de crescimento na fitoextração e fitoacumulação de metais e na tolerância das plantas na presença de metais.

6.4.3. Estratégias para divulgação científica e popularização da ciência para conservação da Restinga

A divulgação dos resultados do monitoramento da Restinga obtidos durante o monitoramento e a popularização da ciência serão estratégias de promoção da conservação do ecossistema Restinga. Serão desenvolvidos: manual de identificação das espécies encontradas nas estações amostrais; um guia prático de identificação de sementes de espécies com uso potencial na recuperação de áreas impactadas pelos rejeitos de minério; mostruário de sementes e frutos (carpoteca) destinados à pesquisa e ao ensino de Ciências no Herbário VIES-UFES. Somados a isso, cartilhas informacionais serão produzidas a fim de proporcionar a abordagem de aspectos temáticos de forma interdisciplinar, com o objetivo de divulgação da importância da restinga e sua conservação para comunidade local.

7. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10006 – Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos, 2004.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10007 – Amostragem de resíduos sólidos, p.21, 2004.

AHMED, S., OTHMAN, N. H. 2017. The anti-cancers of Tualang honey in modulating breast carcinogenesis: An experimental animal study. BMC Complementary and Alternative Medicine 17(1): 111.

ALTSCHUL, S.F., GISH W., MILLER, W., MYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. J. of Mol. Biol., v. 215: p. 403-407, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Química Nova, v. 33, n. 10, 2010. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5838. Acesso em 13 jun 2022.

ANDRADE, C. K., ANJOS, V. E., FELSNER, M. L., TORRES, Y. R., & QUINAIA, S. P. 2014. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. Food Chemistry 146: 166–173

BACARIN, M. A., MARTINAZZO, E. G., CASSOL, D., FALQUETO, A. R., SILVA, D. M. Daytime variations of chlorophyll a fluorescence in pau d'alto seedlings. Revista Árvore, v.40, n.6, p.1023-1030, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-67622016000600007>. Acesso em 13 jun 2022.

BARTHA, S., TAUT, I., GOJI, G., VLAD. I.A. & DINULICA, F. 2020. Heavy metal content in polyfloral honey and potential health risk. A case study of cops, a Mica, Romania. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17: 1507.

BENCKE, C.S.C. & MORELLATO, P.C. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. Revista Brasileira de Botânica, 25(3): 269-275.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. Anal Biochem v. 239, p. 70-76, 1996.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p.209-222, 2004.

BOYD, P. W., ELLWOOD, M. J. The biogeochemical cycle of iron in the ocean. Nature Geoscience, v. 3, n.10, p.675-682, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ngeo964>.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248–254, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Acesso em: 14 nov. 2020.

BROWER, J.E.; ZAR, J.H. *Field and Laboratory Methods for General Ecology*. Dubuque. Iowa: William C. Brown Company Publishers, 320p. 1977.

BRASIL. 2018. Portaria Nº 463, de 18 de dezembro de 2018. Áreas Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira ou Áreas Prioritárias para a Biodiversidade. *Diário Oficial da União*, 243(1): 160.

BRASIL. 2021. Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. *Diário Oficial da União* 61.

BROWER, J.E., ZAR, J.H. *Field and Laboratory Methods for General Ecology*. 2nd Ed. Boston: Brown Publishers. 226p. 1984.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities on root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, v.83, p.463-468, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>. Acesso em: 14 nov. 2020.

CARILLO, P.; GIBON, Y. PROTOCOL : Extraction and determination of proline. Prometheus Wiki. 2011. Disponível em: <http://prometheuswiki.org/tiki-index.php?page=Extraction+and+determination+of+proline>. Acesso em: 14 nov. 2020.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society American Journal*, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

CHANDRAMA S., SHUBHARANI R. & SIVARAM V. 2014. Assessment of heavy metals in honey by atomic absorption spectrometer. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(8): 509–515.

CHEN, Y. E., CUI, J. M., LI, G. X., YUAN, M., ZHANG, Z. W., YUAN, S., ZHANG, H. Y. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, v.60, p.139-147, 2016.

CHUNG, S., KONG, H., BUYER, J. S., LAKSHMAN, D. K., LYDON, J., KIM, S. D., & ROBERTS, D. P. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n.1, p.115-123, 2008.

CITAK, D., SILLICI, S., TUZEN, M., SOYLAK, M. 2012. Determination of toxic and essential elements in sunflower honey from Thrace Region, Turkey. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 107e113.

CLINEBELL, R.R., PHILLIPS, O.L., GENTRY, A.H., STARK, N., ZUURING, H. Prediction of neotropical tree and liana species richness from soil and climatic data. *Biodiversity and Conservation*, v.4, p.56-90, 1995.

COSTA, T. S., CEVOLANE, N. S., FALQUETO, A. R. E AOYAMA, E. M. Influência de diferentes concentrações salinas na germinação de sementes e vigor de plântulas de *Canavalia rosea* da Restinga de Guriri, São Mateus/ES. *Revista de Ciências Agro-Ambientais*, v.11, n.1, p.77-87, 2013.

CUNHA, V.L.C.D.M. Tratamentos pré-germinativos para *Scaevola plumieri* (L.) Vahl (Goodeniaceae). 2005. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / Instituto de Florestas. 2005.

D'EÇA-NEVES, F.F. & MORELLATO, P.C. 2004. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. *Acta Botanica Brasilica*, 18(1): 99-108.

DAFNI, A., FIRMAGE, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. Springer, Vienna.

DIMKPA, Christian O.; DIRK, Merten; ALES, Svatos; GEORG, Buchel; ERIKA, Kothe. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol. Biochem.*, v.41, p.154–162, 2009.

ERDTMAN G. 1960. The acetolysis method – A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561–564.

ESPÍRITO SANTO. 2010. Decreto nº 2530-R. Identifica Áreas Prioritárias para Conservação da Biodiversidade no Estado. *Diária Oficial dos Poderes do Estado* 22589: 5-6.

FARIA-SILVA, L., GALLON, C.Z.; PURGATTO, E.; SILVA, D.M. Photochemical metabolism and fruit quality of Ubá mango tree exposed to combined light and heat stress in the field. *Acta Physiol Plant*, v. 39, p. 238, 2017.

FERNIE, A.R., ROSCHER, A., RATCLIFFE, R.G., AND KRUGER, N.J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, v.212, p.250–263, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004250000386>. Acesso em: 14 nov. 2020.

FONSECA, D.C., OLIVEIRA, M.L.R., PEREIRA, I.M., CABRAL, M.C., MOURA, C.C. & MACHADO, E.L.M. 2017. Phenological strategies of dioecious species in response to the environmental variations of rupestrian grasslands. *Cerne*, 23(4): 517-527.

FORMICKI, G., GREN, A., STAWARZ, R., ZYSK, B., & GAŁ, A. 2013. Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies* 22(1): 99–106.

FREITAS, R. M.; ARAI, E.; ADAMI, M.; SOUZA, A. F.; SATO, F. Y.; SHIMABUKURO, Y. E.; ROSA, R. R.; ANDERSON, L. O.; RUDORFF, B. F. T. Virtual laboratory of remote sensing series: visualization

of MODIS EVI2 data set over South America. *Journal of Computational Interdisciplinary Sciences*, v.2, p.57-64. 2011.

GALL, J.E., BOYD, R.S. & Rajakaruna, N. 2015. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 201.

GENTRY, A.H. The distribution and evolution of climbing plants. In: Putz, F.E.; Mooney, H.A. (Eds.). *The Biology of Vines*. Cambridge: Cambridge University Press, p.3-49, 1991.

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, v.106, n1, p.207-212, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6). Acesso em: 13 jun. 2022.

HIGGINS, M.A., RUOKOLAINEN, K. Rapid Tropical Forest Inventory: A comparison of techniques based on inventory data from Western Amazonia. *Conservation Biology*, v.18, p.799–811, 2004.

HLADUN, K.R., PARKER, D.R. & TRUMBLE, J.T. 2011. Selenium accumulation in the floral tissues of two Brassicaceae species and its impact on floral traits and plant performance. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 90–97.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils Berkeley. California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

IBGE. 2020. Mel de abelha. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/pesquisa/18/16574?tipo=ranking&indicador=16575>. Acesso em 09/06/2022.

INCAPER. 2022. Apicultura. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/apicultura>. Acesso em 09/06/2022.

JIANG, Z., HUETE, A., DIDAN, K., MIURA, T. Development of a two-band enhanced vegetation index without a blue band. *Remote Sensing of Environment*, v.112(10): p.3833–3845, 2008.

JONES G. D. & BRYANT V. M. JR. 2004. The use of ETOH for the dilution of honey. *Grana* 43(3): 174–182.

KALAJI, H. M; JAJOO, A; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R. J. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant*, v. 38, p. 102, 2016.

KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology*, v.107, p.725-735, 1995. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/107/3/725.full.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2020.

LALLOO, R., RAMCHURAN, S., RAMDUTH, D., GÖRGENS, J., GARDINER, N. (2007) Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *J. of Appl. Microbiol.*, v.103, p.1471–1479.

LI, Y.; LIN, Y.; LOUGHLIN, P.; CHEN, M. Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll f. *Front Plant Sci* v.25: p.5–67, 2014.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and experimental botany*, v.47, n.3, p.239-247, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00130-7). Acesso em: 14 nov. 2020.

LISEC, J.; SCHAUER, N. KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*. v.1, p.387–396, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>. Acesso em: 14 nov. 2020.

LOUVEAUX J. MAURIZIO A. & VORWOHL G. 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World* 59(4): 139–157.

MAGALHÃES M. S. 2010. Mel e pólen de abelhas *Apis mellifera* como bioindicadores de poluição ambiental por metais pesados. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto.

MAGNAGO, L.F.S., MARTINS, S.V., SCHAEFER, C.E.G.R. & NERI, A.V. 2010. Gradiente fitofisionômico-edáfico em formações florestais de Restinga no Sudeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 24(3): 734-746.

MAGNAGO, L.F.S., MARTINS, S.V., SCHAEFER, C.E.G.R. & NERI, A.V. 2012. Restinga forests of the Brazilian coast: richness and abundance of tree species on different soils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(3): 245-261.

MAGNAGO, L.F.S., MARTINS, S.V., SCHAEFER, C.E.G.R. & NERI, A.V. 2013. Structure and diversity of restinga along a flood gradient in Southeastern Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 27(4): 801-809.

MAHESHWARI, R.; BHUTANI, N.; SUNEJA, P. Isolation and characterization of ACC Deaminase Producing Endophytic *Bacillus mojavensis* PRN2 from *Pisum sativum*. *Iranian J Biotech*. v.18, n.2, e2308, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.137279.2308>. Acesso em: 16 mai. 2022.

MANDAL M.D. & MANDAL S. 2011. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(2): 154–160.

MEINDL, G.A. & ASHMAN, T. 2013. The effects of aluminium and nickel in nectar on the foraging behaviour of bumblebees. *Environmental Pollution*, 177: 78e81.

MESA, J., RODRÍGUEZ-LLORENTE, I. D., PAJUELO, E., PIEDRAS, J. M. B., CAVIEDES, M. A., REDONDO-GÓMEZ, S., MATEOS-NARANJO, E. Moving closer towards restoration of contaminated estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metal rhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. *Journal of Hazardous Materials*, v.300, p.263–271, 2015.

MOAR N. T. 1985. Pollen analysis of New Zealand honey. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 28(1): 39–70.

MORELLATO, L.P.C., RODRIGUES, R.R., LEITÃO FILHO, H.F.; JOLY, C.A. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semi-decídua na Serra do Japi, Jundiaí. Revista Brasileira de Botânica, v.12, p.85-98, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200012>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MORELLATO, P.C. & LEITÃO-FILHO, H.F. 1996. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian Forest. Biotropica, 28 (2): 180-191.

MÜELLER-DOMBOIS, D.; ELLENBERG, H. Aims and methods of vegetation ecology. New York: John Wiley and Sons Inc., 547p. 1974.

NAGAJYOTI, P.C., LEE, K.D. & SREEKANTH, T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environmental Chemistry Letters, 8: 199e216.

NAIK, P.R., RAMAN, G., NARAYANAN, K.B. et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. BMC Microbiol, v.8, 230, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-230>. Acesso em: 13 mai. 2022.

NUNES-NESI, A., CARRARI, F., GIBON, Y., SULPICE, R., LYTOVCHENKO, A., FISAHN, J., RATCLIFFE, R.G., SWEETLOVE, L.J., AND FERNIE, A.R. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. The Plant Journal, v.50, p.1093–1106, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>. Acesso em: 14 nov. 2020.

PEREIRA, O.J. 2003. Restinga: origem, estrutura e diversidade. Jardim, M.A.G.; Bastos, N.N.C. & Santos, J.U.M. (Eds.) Desafios da Botânica Brasileira no Novo Milênio: Inventário, Sistematização e Conservação da Diversidade Vegetal. Belém: MPEG, UFRA; Embrapa, Brasil/Museu Paraense Emílio Goeldi. p.177-179.

PEREIRA, O.J.; ASSIS, A.M. & SOUZA, R.L.D. 1998. Vegetação da Restinga de Pontal do Ipiranga, Município de Linhares, ES. In: Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros. São Paulo: ACIESP, nº 104, v. 3., p. 117-128.

PEREIRA, O.J.; BORG, J.H.; RODRIGUES, I.D. & ASSIS, A.M. 2000. Composição florística de uma floresta de Restinga no município da Serra, ES. In: Anais do V Simpósio de Ecossistemas Brasileiros: Conservação. São Paulo: ACIESP, nº 109, v. 3., p. 74-83.

PHILLIPS, O.; MILLER, J.S. Global patterns of plant diversity: Alwyn H. Gentry's forest transect data set. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.89, p.1-319, 2002.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R.; FONTES, E. P.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. Plant science, v. 167, n.6, p.1307-1314, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.027>. Acesso em: 14 nov. 2020.

POHREN, R. DE S.; DA COSTA, THATIANA C.; VARGAS, VERA M. F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. *Water, Air, & Soil Pollution*, v.224, n.3, p.1460, 2013.

POLJAKOFF-MAYBER, A.; J. GALE. *Plants in Saline Environments*. Heidelberg: Springer Berlin, 216p. 195.

PREMRATANACHAI P. & CHANCHAO C. 2014. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(5): 337–344.

QUINN, C.F., PRINS, C.N., FREEMAN, J.L., GROSS, A.M., HANTZIS, L.J., REYNOLDS, R.J.B., YANG, S., COVEY, P.A., BAÑUELOS, G.S., PICKERING, I.J., FAKRA, S.C., MARCUS, M.A., ARATHI, H.S., & PILON-SMITS, E.A.H. 2011. Selenium accumulation in flowers and its effects on pollination. *New Phytologist*, 192: 727–737.

RAAIJMAKERS JM, WELLER DM & THOMASHOW LS. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.881–887, 1997.

RAHMAN, A.F.; GAMON, J.A.; FUENTES, D.A.; ROBERTS, D.; PRENTISS, D.; QIU, H. Modelling CO₂ flux of boreal forests using narrow-band indices from AVIRIS imagery. AVIRIS Workshop, JPL/NASA, Pasadena, California, 2000.

REED, M.L.E., GLICK, B. R. (2005) Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.*, v.51, p.1061-1069.

RICHARDS, P.W. 1952. *The tropical rain forest: an ecological study*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

RISSE, J.; RIZZI, R.; RUDORFF, B. F. T.; ADAMI, M.; SHIMABUKURO, Y. E.; FORMAGGIO, A. R.; & EPIPHANIO, R. D. V. Índices de vegetação Modis aplicados na discriminação de áreas de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n.9, p.1317-1326, 2012.

SEARCY, K.B. & MULCAHY, D.L. 1985. Pollen tube competition and selection for metal tolerance in *Silene dioica* (Caryophyllaceae) and *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 72: 1695e1699.

SEVERI, J. A. Prospecção químico-farmacológica de plantas. 89p. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), – Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “JÚLIO de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

SHARIFI, ROUHALLAH; RYU, CHOONG-MIN. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, v. 122, n. 3, p. 349-358, 2018.

SHIVANNA, K.R. & RANGASWAMY, N.S. 1993. *Pollen biology – A laboratory manual*. Narosa Publishing House, New Delhi.

SILVA, E., GUILHERME, M. D. F., OLIVEIRA, H., VIANA, Z., & SANTOS, V. L. Caracterização morfológica e efeitos ecotoxicológicos do chumbo na germinação de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Arq. Inst. Biol., p. 1-7, 2017.

SILVA, M.C.N.A. & RODAL, M.J.N. 2009. Padrões das síndromes de dispersão de plantas em áreas com diferentes graus de pluviosidade, PE, Brasil. Acta Botanica Brasilica 23(4): 1040-1047.

SILVEIRA-JÚNIOR C.E.A., SILVA G.R. DA, GOMES A.N.P., SILVA T.M.S. DA, ARRUDA R. & SANTOS F.A.R. dos. 2020. Evaluation of honey quality of Northeast of Brazil: botanical origin and heavy metals content, Journal of Apicultural Research. DOI: 10.1080/00218839.2020.1749450

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg. 1797, 1313-1326, 2010.

STREHER, A.S. & SILVA, T.S.F. 2015. Geração de imagens sintéticas Landsat TM para a avaliação da fenologia de diferentes fitofisionomias na região do Espinhaço Meridional, MG. Conference Paper, p. 1-8.

SUN, H., DANG, S., XIA, Q., TANG, W. & ZHANG, G. 2011. The effect of dietary nickel on the immune responses of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. Journal of Insect Physiology, 57: 954-961.

TALORA, D.C. & MORELLATO, P.C. 2000. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 23(1): 13-26.

THOMPSON, J.D.; HIGGIS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., v. 22: p. 4673-4680, 1994.

U.S. EPA. Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils. Revision 1. Washington, DC, 2007.

VÁLIO, I.F.M.; SCARPA, F.M. Germination of seeds of tropical pioneer species under controlled and natural conditions. Rev. Bras. Bot. v. 24, n.1, p.79-84, 2001.

VELOSO, E. M.; FILHO, A. L. R. R. & LIMA, J. C. A. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, 123p.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. Marine Environmental Research, v.44, p.69-84, 1997.

WANG, C.; KNILL, E.; GLICK, B.R.; DÉFAGO, G. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA*

derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol*, v.46, p.898–907, 2000.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. v.144, n3, p.307-313, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2). Acesso em: 14 nov. 2020.

WHITE, J. W., JR., & DONER, L. W. 1980. Honey composition and properties. In E. C. Martin, E. Oertel, N. P. Nye, G. D. Waller, N. M. Kauffeld, S. Taber, L. N. Standifer, B. F. Detroy, J. R. Harbo, T. E. Rinderer, K. W. Tucker, F. E. Moeller, J. W. White JR, L. W. Doner, S. E. McGregor, H. SHIMANUKI, W. T. WILSON, P.E. SONNET, A. STONER, T. LEHNERT, et al. *Beekeeping in the United States*, pp. 1–193. Department of Agriculture.

WU, Z., DU, Y., XUE, H., WU, Y. & ZHOU, B. 2012. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging*, 33: 199.e1e199.e12.

XUN, E., ZHANG, Y., ZHAO, J. & GUO, J. Translocation of heavy metals from soils into floral organs and rewards of *Cucurbita pepo*: implications for plant reproductive fitness. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 235-243.

YEMM, E.M. COCKING, E.C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, v.80, p.209-213, 1955. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>. Acesso em: 14 nov. 2020.

ZANZARINI, F.V.; PISSARRA, T. C. T.; BRANDÃO, F. J. C.; TEIXEIRA, D. D. B. Correlação espacial do índice de vegetação (NDVI) de imagem Landsat/ETM+ com atributos do solo. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* v. 17, n. 6, p. 608-614, 2013.

MANGUEZAL

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Mônica Maria Pereira Tognella	Coordenação de monitoramento do manguezal	UFES
Antelmo Ralph Falqueto	Coordenação Fisiologia	UFES
Edilson Romais Schmidt	Coordenação Estatística	UFES
Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo	Coordenação Cultivo ex situ e metais vegetação	UFES
Helia Del Carmen Farias Espinoza	Coordenação Cartografia e Mapeamento	UNIVALI
Marcelo Barcellos Da Rosa	Coordenação análises estresse oxidativo	UFES
Camila Patrício de Oliveira	Pesquisador	UFES
Dielle Meire de Santana Lopes	Pesquisador	UFES
Eduardo Almeida Filho	Pesquisador	UFES
Karen Otoni de Oliveira Lima	Pesquisador	UFES
Laís Altoé Porto	Pesquisador	UFES
Neilson Victorino de Brites Júnior	Pesquisador	UFES
Raquel Vidal dos Santos Leopoldo	Pesquisador	UFES
Samira Leite	Pesquisador	UFES
Saulo Furtado Ronconi Vieiras	Técnico	UFES
Sávia Soares Pascoalini	Pesquisador	UFES
Uly Depolo Barcelos	Pesquisador	UFES
Verônica D'Addazio	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Médio	Técnico	UFES
Técnico Nível Médio	Técnico	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

Este tema envolve o monitoramento e avaliação dos manguezais distribuídos ao longo da costa norte do litoral capixaba. Como pontos focais foram selecionadas as seguintes áreas de estudo: rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim, foz do Rio Doce, rio Mariricu (Barra Nova) e rio São Mateus (Conceição da Barra).

Esforços serão concentrados na avaliação da presença/concentração de metais nos compartimentos vegetais e no sedimento e seus efeitos sobre a produção primária e o estresse oxidativo das florestas de mangue e na vegetação paludal do Rio Doce, analisando padrões espaços-temporais dos parâmetros bióticos e abióticos, dando continuidade ao monitoramento já iniciado (RRDM, 2022, RT-39C, Anexo 5 Manguezal). Subsequente, cultivos *ex situ* serão realizados inicialmente com o contaminante Ferro e Manganês para diagnóstico da concentração tóxica e avaliação de alterações morfológicas e fisiológicas que possam ocorrer. A próxima etapa constará na avaliação do sinergismo entre o Ferro e Manganês sobre o desenvolvimento da flora.

Em relação a fauna, haverá concentração sobre as espécies chave no ecossistema manguezal (*Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi*) e que são de importância econômica e ecológica ou que se encontrem em risco de extinção. A estrutura e dinâmica das populações de ambas as espécies serão avaliadas e monitoradas sazonalmente (período chuvoso e seco) nas áreas amostrais para verificar alterações sazonais e espaciais nos parâmetros populacionais (tamanho médio da carapaça e densidade média), como observado nos últimos anos (RRDM, 2022, RT-39C, Anexo 5 Manguezal), e a relação com as variáveis abióticas nos diferentes compartimentos de interação (flora e sedimento) e auxiliar no diagnóstico do estado atual das duas espécies estudadas. *U. cordatus*, por sua importância econômica para as comunidades tradicionais, terá sua fecundidade (ovos/fêmea) monitorada para verificar o seu potencial reprodutivo nos estuários do rio Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Mariricu e São Mateus. A fecundidade de *C. guanhumi* será estimada apenas no Rio Doce por estar classificada como vulnerável (VU) na Lista de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no estado do Espírito Santo.

3. OBJETIVO

Avaliar as áreas de manguezal no litoral norte capixaba para monitoramento da dispersão dos contaminantes provenientes do rompimento da barragem de contenção de material da mineradora SAMARCO e suas consequências sobre a biota e qualidade ambiental destas florestas.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Estrutura e Funcionamento da flora do Rio Doce e dos Manguezais de Aracruz (Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim), BARRA NOVA (RIO MARIRICU) e Conceição da Barra (Rio São Mateus)

Submeta 1.1. Levantamento ao final do monitoramento da estrutura da vegetação halófito na planície lamosa do estuário do Rio Doce e de Florestas de mangue nas porções baixo, médio e alto estuário das parcelas fixas nos bosques de franja e bacia já estabelecidas.

Submeta 1.2. Determinação da produção primária. Estimativa dos dados de fotossíntese, de fluorescência da clorofila *a*, da concentração dos pigmentos fotossintéticos e de uso eficiente da água.

Submeta 1.3. Determinação da atividade antirradicalar.

Submeta 1.4. Amostragem de material (folhas e sedimento) para obtenção da concentração de metais. Inclusão de ponto de referência para o rio São Mateus para as análises de metais em folhas.

Justificativa da Meta 1: Etapa proposta de monitoramento por meio de obtenção de dados de fisiologia vegetal que identifiquem estresse ambiental ou perda de qualidade da floresta e correlacionar com os dados abióticos de dispersão e concentração dos contaminantes no corpo hídrico e sedimento, se

pertinente. Em longo prazo será possível identificar se há sinergismo das concentrações dos contaminantes com os tensores naturais do ambiente e suas consequências para a resiliência do ecossistema e sua conservação com qualidade.

META 2 – Diagnóstico sobre a fauna do manguezal, compartimento caranguejos

Submeta 2.1. Avaliação da estrutura e dinâmica populacional dos decápodes das espécies *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi* nos manguezais dos estuários dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, foz do rio Doce e São Mateus.

Submeta 2.2. Estimativa da fecundidade de *U. cordatus* nos estuários monitorados e de *C. guanhumi* na foz do Rio Doce.

Submeta 2.3. Mapeamento dos habitats das espécies de *U. cordatus* e *C. guanhumi* na foz do Rio Doce, nos manguezais dos estuários dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, e São Mateus.

Justificativa da Meta 2: Etapa necessária uma vez que as áreas costeiras, que estão sob influência da pluma de sedimentos originada pelo rompimento da barragem de contenção de minérios da SAMARCO, são habitats para as espécies *U. cordatus* e *C. guanhumi*. Sendo ambas importantes ecologicamente, como engenheiras do ecossistema, e economicamente como recursos naturais que sustentam uma gama de comunidades tradicionais com base no extrativismo. A segunda espécie é considerada sobreexplorada no Brasil (AMARAL e JABLONSKI, 2005; BRASIL, 2005) e em 2014 foi inserida na Lista Oficial Nacional de Espécies Ameaçadas como “Criticamente em perigo de extinção”. No Espírito Santo, encontra-se no período de defeso por tempo indeterminado – DECRETO SEAMA/ES nº 1499-R, de 2008 o que torna mais significativo seu monitoramento, uma vez que sua captura foi proibida visando a conservação destas populações. Diferentes estudos comprovaram os danos letais que os metais provocam nestas espécies tanto por sua ação tóxica aguda quanto pela bioacumulação. Reforça-se a necessidade de monitoramento em longo prazo e o acompanhamento da fecundidade, um dos parâmetros biológicos utilizados para determinar o potencial reprodutivo da espécie, que irá permitir verificar se houve alterações significativas na produção média de ovos por fêmea, e quais os possíveis fatores que estariam influenciando. Ressalta-se que o recurso econômico *U. cordatus* já esteve sob pressão nestes estuários durante o evento da Doença do Caranguejo Letárgico (DCL) e que se encontrava em recuperação. Portanto, os metais poderão agravar este processo.

META 3 - Diagnóstico de contaminação por metais da vegetação dos manguezais de Aracruz (Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim, BARRA NOVA (Rio Mariricu) e Conceição da Barra (Rio São Mateus)

Submeta 3.1. Experimentos in situ de Variabilidade Espacial.

Submeta 3.2. Experimentos ex situ.

Submeta 3.3. Variabilidade espacial e correlação de metais pesados em sedimentos e vegetação de mangue na região atingida pelos rejeitos de mineração na foz do Rio Doce.

Justificativa da Meta 3: Esta meta irá contribuir para o diagnóstico da contaminação das florestas de manguezais e também na vegetação do Rio Doce. Com os dados da meta 1 e os objetivos desta meta será possível avaliar o impacto que o aumento dos metais tóxicos e não tóxicos podem ter sobre o desenvolvimento e a manutenção da qualidade ambiental destas florestas.

5. PRODUTOS

DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoa/Vinculado)
Meta 1 - Parâmetros estruturais da vegetação de <i>Talipariti pernambucense</i> , <i>Laguncularia racemosa</i> , <i>Rhizophora mangle</i> e <i>Avicennia sp.</i> - Parâmetros de trocas gasosas (fotossíntese) em <i>Talipariti pernambucense</i> , <i>Laguncularia racemosa</i> e <i>Rhizophora mangle</i> ; - Parâmetros de fluorescência da clorofila a em <i>T. pernambucense</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> ; - Concentração de pigmentos fotossintéticos em <i>T. pernambucense</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> ; - Atividade antirradicalar em <i>T. pernambucense</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> ; - Concentração elementar de metais nas folhas de <i>T. pernambucense</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> ; - Concentração elementar de metais no sedimento da foz do Rio Doce e em manguezais dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Barra Nova e São Mateus; - Manutenção destas amostragens, reforçando agora coletas semestrais (período chuvoso e seco).	Mônica Tognella Antelmo Falqueto Edilson Schmildt Marcelo da Rosa
Meta 2 - Densidade média de <i>U. cordatus</i> e <i>C. guanhumi</i> ; - Largura média do cefalotórax de <i>U. cordatus</i> e <i>C. guanhumi</i> ; - Razão sexual de <i>U. cordatus</i> e <i>C. guanhumi</i> ; - Fecundidade média de <i>U. cordatus</i> e <i>C. guanhumi</i> ; - Mapas de densidade e tamanho médio da carapaça das duas espécies para cada estuário nos períodos chuvoso e seco.	Mônica Tognella Helia Farias
Meta 3 - Crescimento do epicótilo das plântulas de <i>R. mangle</i> cultivadas em diferentes concentrações de Fe e Mn e no sinergismo destes dois metais; - Número de folhas das plântulas de <i>R. mangle</i> cultivadas em diferentes concentrações de Fe e Mn e no sinergismo destes dois metais; - Parâmetros da Fluorescência da clorofila a das plântulas de <i>R. mangle</i> cultivadas em diferentes concentrações de Fe e Mn e no sinergismo destes dois metais; - Parâmetros de trocas gasosas das plântulas de <i>R. mangle</i> cultivadas em diferentes concentrações de Fe e Mn e no sinergismo destes dois metais; - Dados de matéria orgânica, granulometria do sedimento e carbonato de cálcio; - Teor de metais no sedimento.	Mônica Tognella Antelmo Falqueto Edilson Schmildt Marcelo da Rosa Andreia Gontijo

ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 23º mês de vigência do Projeto)	RESPONSÁVEL (Pessoa Vinculado)
Meta 1 - Análise espaço-temporal da estrutura vegetal em <i>T. pernambucense</i> , <i>Avicennia sp.</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> ; - Análise espaço-temporal de trocas gasosas (fotossíntese) em <i>T. pernambucense</i> , <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> ;	Mônica Tognella Antelmo Falqueto, Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo Edilson Schmildt

- Análise espaço-temporal da fluorescência da clorofila <i>a</i> em <i>T. pernambucense</i>, <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i>; - Análise espaço-temporal da concentração de pigmentos fotossintéticos em <i>T. pernambucense</i>, <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i>; - Análise espaço-temporal da atividade antirradicalar em <i>T. pernambucense</i>, <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i> - Análise espaço-temporal da concentração de metais nas folhas de <i>T. pernambucense</i>, <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i>; - Análise espaço-temporal da concentração elementar de metais no sedimento da foz do Rio Doce e em manguezais dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Barra Nova e São Mateus. - Correlações entre parâmetros fisiológicos e teor de metais nas folhas. - Correlações entre parâmetros fisiológicos com atividade antirradicalar.	Marcelo da Rosa Renato Neto* Fabian Sá*
Meta 2 - Análise espaço-temporal da estrutura e densidade de <i>U. cordatus</i> e <i>C. guanhumi</i>; - Histogramas de distribuição de frequência das classes de largura do cefalotórax de <i>U. cordatus</i> e <i>C. guanhumi</i>; - Análise espaço-temporal da fecundidade de <i>U. cordatus</i>; - Análise temporal da fecundidade média de <i>C. guanhumi</i>; - Correlação entre parâmetros populacionais de <i>U. cordatus</i> e variáveis ambientais; - Análise de Componentes Principais entre parâmetros populacionais de <i>U. cordatus</i> e variáveis ambientais; - Mapeamento dos habitats de <i>U. cordatus</i> nas áreas de estudo do litoral capixaba de acordo com imagens disponíveis; - Mapeamento dos habitats de <i>C. guanhumi</i> nas áreas de estudo do litoral capixaba de acordo com imagens disponíveis.	Mônica Tognella Helia Farias
Meta 3 - Análise da toxicidade do Fe e Mn para a espécie <i>R. mangle</i> - Determinação da taxa de mortalidade nos experimentos e taxa de crescimento. - Correlação entre mortalidade e toxicidade, bem como potencialidade com relação aos dados de metais obtidos em campo. - Análise do estresse causado pelo efeito tóxico do Fe e Mn na produção primária. - Análise do sinergismo entre Fe e Mn no desenvolvimento inicial e fisiológico nas plântulas de <i>R. mangle</i>. - Correlacionar teor de metais nas folhas e sedimento. - Análises multivariadas entre parâmetros fisiológicos e concentração de metais para <i>T. pernambucense</i>, <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i>; - Análise multivariada entre atividade antirradicalar e concentração de metais para <i>T. pernambucense</i>, <i>L. racemosa</i> e <i>R. mangle</i>; - Análises multivariadas entre metais no tecido foliar e no sedimento.	Mônica Tognella Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo Edilson Schmidt Antelmo Falqueto Marcelo da Rosa

6. METODOLOGIA

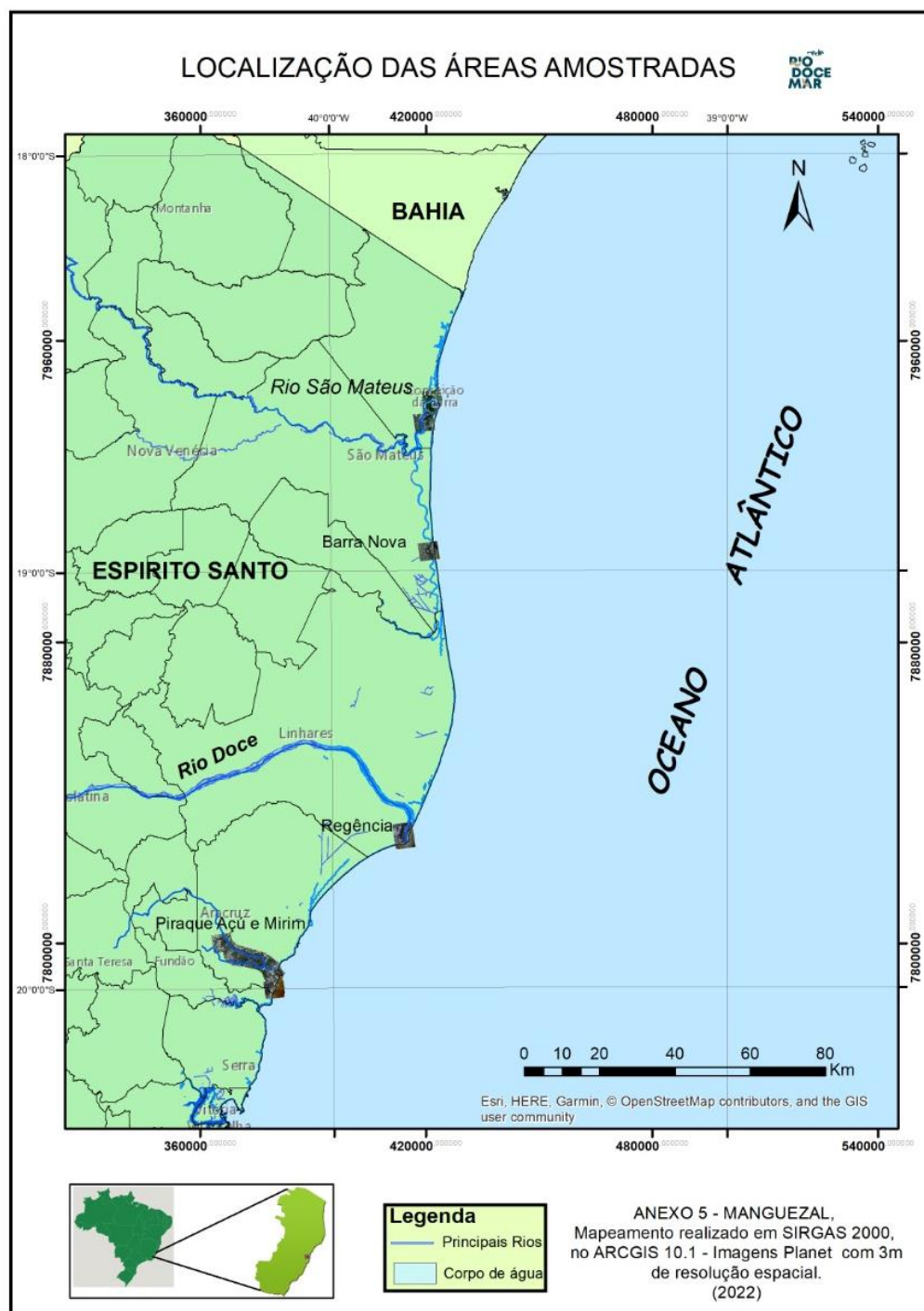
6.1. Malha e frequência amostral

As coletas de dados das variáveis populacionais e ambientais serão realizadas nos períodos chuvoso e seco no manguezal dos estuários dos rios Piraquê-Açu e Piraquê-Mirim (377123.22 m E, 7793841.94 m S), São Mateus (422676.94 m e, 7943585.45 m S), Barra Nova (421458,2 m E, 7904479,2 m S) e na foz do Rio Doce (4136687.10 m E, 7827397.50 m S) (Figura 2). A Tabela 4 apresenta o número de parcelas fixas que serão monitoradas em cada estuário/área.

Tabela 4: Número de parcelas fixas em cada estuário/área monitorado.

Município	Estuário/Área	Nº de parcelas fixas
Aracruz	Piraquê-Açu	13
Aracruz	Piraquê-Mirim	12
Linhares	Foz do Rio Doce	3
São Mateus	Barra Nova (Rio Mariricu)	3
Conceição da Barra	São Mateus	13

Figura 2: Localização das áreas que serão amostradas ao longo do monitoramento do PMBA.



6.2. Meta 1 - Estrutura e Funcionamento da Flora do Rio Doce e dos Manguezais de Aracruz (Piraquê-Açu E Piraquê-Mirim), Barra Nova (Rio Mariricu) d Conceição Da Barra (Rio São Mateus)

6.2.1. *Fitossociologia da vegetação paludal do rio doce e da vegetação de manguezal*

A estrutura da vegetação será realizada ao final do monitoramento nos estuários do rio Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Mariricu, São Mateus e na foz do rio Doce, seguindo metodologia proposta por Schaeffer-Novelli e Cintrón (1986).

Em campo, todos os indivíduos que compõe a parcela serão identificados em termos de espécie e medidos quanto à altura dos mesmos e o diâmetro dos troncos à altura do peito (DAP), serão aferidos os números de troncos de todos os indivíduos e conferidos quanto à sua condição (vivo ou morto).

A partir da análise destes parâmetros será possível verificar o desenvolvimento estrutural calculando os seguintes parâmetros por estação: densidade de tronco vivos, altura média, DAP médio, área basal de troncos vivos e mortos, dominância em área basal por espécie, relação tronco/indivíduo e classe de diâmetro. Posteriormente, serão elaborados histogramas de distribuição do percentual de troncos vivos e mortos por estação e por classe diamétrica (cm). Será realizada a análise das relações entre o DAP médio e a densidade de troncos em cada parcela estudada, tendo como referência o modelo proposto por Jimenez et al. (1985). Para essa análise será avaliado o ajuste ao referido modelo dos dados obtidos, tanto para as estações estudadas no presente monitoramento, como para os dados disponíveis nos anos anteriores e de estudos anteriores ao rompimento da barragem, disponíveis tanto na literatura, como no banco de dados do GEMA/UFES, bem como dos dados levantados pela Golder imediatamente após o rompimento da barragem. A análise das relações entre o DAP médio e a densidade de troncos em cada parcela estudada será calculada utilizando a seguinte equação: $y = \ln 7496 - (1.4934) \ln x$

6.2.2. *Análises Fotossintéticas*

Material vegetal e condições de amostragem

Os parâmetros de fluorescência e trocas gasosas continuarão a ser monitorados, de forma semestral e em eventos estocásticos, nas folhas de 2º par dos indivíduos previamente identificados, sendo selecionados cinco indivíduos da espécie dominante na área. A *T. pernambucense*, na foz do Rio Doce e a jusante nos rios São Mateus e Piraquê-Açu. E no caso dos manguezais, a espécie *R. mangle*, porém nas estações em que esta não ocorre, a espécie dominante da parcela foi selecionada, nesse sentido indivíduos de *L. racemosa* continuarão a ser monitorados em duas estações no rio São Mateus e uma estação em Barra Nova dentro do PMBA. De cada indivíduo, folhas serão selecionadas dentro daquelas avaliadas como intactas e completamente expandidas (n = 6).

Fluorescência da Clorofila a

As medidas da fluorescência da clorofila a serão realizadas utilizando um fluorômetro portátil Handy-PEA (Hanstech Instruments Ltd., King's Lynn, Norkfolk, UK). As folhas serão previamente adaptadas ao

escuro por 30 minutos (FALQUETO et al., 2008) utilizando-se clipes foliares (HansatechInstruments, UK) para a oxidação completa da cadeia de transporte de elétrons. A intensidade de fluorescência em 50 μ (considerado como F0), 100 μ s, 300 μ s, 2 ms (FJ), 30 ms (FI) e a fluorescência máxima (Fm) serão registradas e utilizadas para os cálculos dos parâmetros do teste JIP de acordo com Strasser et al. (2004) e Stirbet e Govindjee (2011).

Assimilação de CO₂ e trocas gasosas

Para as medidas da assimilação de CO₂ será utilizado um medidor portátil de fotossíntese (*Infrared gas analyzer*, IRGA) modelos LCi, LCiT e LcproT (ADC, BioScientific Ltd. Hoddesdon, England).

Análises Estatísticas

Todos os dados serão submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Os parâmetros fisiológicos que apresentarem normalidade e homogeneidade serão comparados entre os períodos (seco e chuvoso) para cada estuário pela ANOVA, seguido do teste post-hoc Tukey. Quando os critérios da ANOVA não forem atendidos, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis será utilizado, seguido do teste de comparações múltiplas *a posteriori* (Teste de Dunn) (ZAR, 2010). Para as análises estatísticas básicas será utilizado o Excel ou o pacote de tratamento estatístico Statistica (STATSOFT®).

Análise de Componentes Principais serão construídas por meio de matriz de correlação dos dados (LEGENDRE e LEGENDRE, 1994), contemplando os períodos chuvosos e secos, no programa R (R CORE TEAM, 2021), usando os pacotes *ggplots* (WICKHAM, 2016), *FactoMineR* (LE et al., 2008), *factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) e *factoInvestigate* (THULEAU E HUSSON, 2020).

O nível de significância estatística considerado será α igual a 0,05 para todos os testes.

6.2.3. Pigmentos Fotossintetizantes

Coleta de folhas

A coleta de amostras de folhas do 3º par, a partir do ápice para a base do ramo, completamente expandidas de *T. pernambucense* será realizada no Rio Doce e para as espécies de mangue a espécie selecionada será *R. mangle*, mas nas estações em que esta não ocorre, a espécie dominante da parcela será selecionada, nesse sentido indivíduos de *L. racemosa* continuarão a ser monitorados em três estações no rio São Mateus e Barra Nova dentro do PMBA. As repetições serão obtidas de 5 indivíduos jovens da espécie. As amostras coletadas serão colocadas em sacos de papel kraft, previamente identificados, e armazenadas em gelo até a chegada ao Laboratório de Ecologia de Manguezais. Todo o material será imediatamente armazenado em freezer à -30°C até o momento da extração. Os pontos de coleta serão os mesmos para pigmentos fotossintetizantes, metal foliar e atividade antirradicalar.

Extração dos pigmentos

Amostras de 1 g de massa fresca congeladas à -30 °C serão transferidas para tubos de ensaio contendo 15 mL de solução de acetona 90% + de 0,5 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO₃). Imediatamente após esse processo, os tubos de ensaio serão acondicionados em temperatura de 2 °C por 48h para extração completa dos pigmentos (modificado de ARAR, 1997). A partir daí, as amostras serão filtradas e o sobrenadante armazenado em frascos âmbar à -30 °C até a análise por espectrofotometria.

O procedimento de extração será realizado de forma que os efeitos da luz, da temperatura e da ação enzimática sobre a degradação da clorofila sejam minimizados. As vidrarias contendo as amostras serão protegidas contra a luz e os solventes de extração serão utilizados gelados. O tempo de extração será mantido ao seu mínimo possível, diminuindo assim a possibilidade de degradação dos pigmentos analisados. Os tubos de ensaio serão vedados com papel alumínio e mantidos em gelo.

Análise em espectrofotometria

Posteriormente à extração, serão determinadas as leituras da densidade ótica em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 470nm, 645nm e 663nm. As determinações das concentrações dos pigmentos fotossintéticos serão realizadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) e expressas em mg mL⁻¹ de massa fresca:

$$\text{Clorofila } a = (12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{645})$$

$$\text{Clorofila } b = (21,5 \times A_{645} - 5,1 \times A_{663})$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{Clora} - 85,02 \text{ Clorb}/198)$$

Onde: A470 = absorbância em 470 nm; A645 = absorbância em 645 nm; A663 = absorbância em 663 nm

Análise estatística

Os dados serão submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Aqueles que não apresentam normalidade são submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis para as comparações entre as espécies e entre os períodos (seco e chuvoso) para cada estuário, seguido do teste de comparações múltiplas (Teste de Dunn) (ZAR, 2010).

Os parâmetros que apresentarem normalidade serão submetidos ao teste ANOVA, seguido do teste post-hoc Tukey. Nas análises estatísticas básicas será utilizado o Excel ou o Software em Genética e Estatística Experimental (Programa GENES).

Análise de Componentes Principais (PCA) separada por espécie será realizada considerando os períodos chuvoso e seco do ano correspondente, sendo construída por meio de matriz de correlação dos dados (LEGENDRE e LEGENDRE, 1994). Para tal, serão utilizados o programa R (R CORE TEAM, 2021), os pacotes *ggplots* (WICKHAM, 2016), *FactoMineR* (LE et al., 2008), *factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) e *factoInvestigate* (THULEAU E HUSSON, 2020). No

6.2.4. Análise Foliar de Macro e Micronutrientes

Coleta e processamento de amostras foliares

Serão realizadas coletas de folhas de *T. pernambucense*, *R. mangle*, e *L. racemosa*, de acordo com sua ocorrência em cada área de estudo, conforme especificado nos itens anteriores. A amostragem seguirá o seguinte protocolo: realizar a coleta manualmente com as mãos limpas, sem necessidade de luvas; retirar 20 folhas maduras completamente expandidas de cada indivíduo amostrando cerca de cinco plantas por estação para obtenção de amostras compostas com aproximadamente 40 g.

Após a coleta, as folhas serão acondicionadas em sacos de papel identificados de acordo com cada estação amostral. As amostras serão secas em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante. Em seguida as folhas serão moídas em moinho tipo Wiley (Marca Tecnal; modelo TE650/1) com peneiras de malha 20 e enviadas para a análise química para determinação de macro e micronutrientes. Para a análise foliar serão considerados os seguintes nutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Co) boro (B), chumbo (Pb) e alumínio (Al).

O N-total será determinado pelo método Kjeldahl, descrito por Bremner (1965). Os demais elementos serão analisados após mineralização pela digestão nítrico-perclórica. O B será determinado colorimetricamente pelo método da Azometina H (WOLF, 1974), após a mineralização por via seca em mufla a 550o C. O P será dosado colorimetricamente pelo método de redução do fosfomolibdato pela vitamina C, de acordo com Braga e Defelipo (1974); o K, por fotometria de emissão de chama; o Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu, por espectrofotometria de absorção atômica; e o S determinado por turbidimetria do sulfato (BLANCHARD et al., 1965).

Análise estatística

Os dados de concentrações de macro e micronutrientes serão submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Aqueles que não apresentam normalidade são submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis para as comparações entre as espécies e entre os períodos (seco e chuvoso) para cada estuário, seguido do teste de comparações múltiplas (Teste de Dunn) (ZAR, 2010).

Os parâmetros que apresentarem normalidade serão submetidos ao teste ANOVA, seguido do teste post-hoc Tukey. Nas análises estatísticas básicas será utilizado o Excel ou o Software em Genética e Estatística Experimental (Programa GENES).

Análise de Componentes Principais (PCA) separada por espécie será realizada considerando os períodos chuvoso e seco do ano correspondente, sendo construída por meio de matriz de correlação de dados (LEGENDRE e LEGENDRE, 1994). Para tal, serão utilizados o programa R (R CORE TEAM, 2021), os pacotes *ggplots* (WICKHAM, 2016), *FactoMineR* (LE et al., 2008), *factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) e *factoInvestigate* (THULEAU E HUSSON, 2020). No geral, considera-se α (alfa) igual a 0,05 como nível de significância estatística para todos os testes.

6.2.5. Atividade Antirradicalar

Coleta e processamento de amostras foliares

Amostragem em campo (mesmos pontos de coleta para análise foliar de macro e micronutriente).

A amostragem seguirá o seguinte protocolo: realizar a coleta manualmente com as mãos limpas, sem necessidade de luvas; retirar 20 folhas maduras completamente expandidas de cada indivíduo amostrando cerca de cinco plantas por estação para obtenção de amostras compostas com aproximadamente 40 g.

Após a coleta, as folhas serão acondicionadas em sacos de papel identificados de acordo com cada estação amostral. As amostras serão secas em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante. Em seguida as folhas serão moídas em moinho tipo Wiley (Marca Tecnal; modelo TE650/1) com peneiras de malha 20 e enviadas para a análise química para determinação da atividade antirradicalar.

Análises em laboratório (DPPH)*

RADICAL DPPH

Para os testes de atividade antioxidante com DPPH todas as soluções metanoicas dos extratos secos serão diluídas em metanol (duas, cinco, dez ou vinte vezes), para que a absorbância medida se mantenha dentro da faixa de trabalho. As soluções já diluídas serão denominadas como soluções de trabalho (ST). Os ensaios serão realizados adicionando alíquotas de 15 µL, 25 µL e 35 µL de cada ST, em cubetas contendo 3,0 mL de solução metanoica de DPPH 0,2 mmol L⁻¹ e a reação será mantida ao abrigo da luz durante 60 minutos antes das medidas espectrofotométricas. Todos os ensaios serão realizados em triplicata. As medidas serão realizadas em espectrofotômetro Lambda 16 da marca Perkin Elmer, monitorando a absorbância das amostras em 517 nm. Os brancos consistem em 3,0 mL de metanol contendo 15 µL, 25 µL ou 35 µL da respectiva ST. O controle negativo será uma solução contendo apenas DPPH 0,2 mmol L⁻¹ em metanol.

O cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH será realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibida} = \left(1 - \frac{[A(a) - A(b)]}{[A(c) - A(b)]} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde A(a) é a absorbância da amostra, A(b) é a absorbância do branco, e A(c) é a absorbância do controle negativo.

A partir das porcentagens inibidas para cada concentração, serão determinados os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH•).

MÉTODO DO RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO (O₂^{-•})

A avaliação da capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical superóxido será baseada na geração do radical O₂^{-•} através do sistema enzimático pela reação da hipoxantina catalisada pela

enzima xantina oxidase. Serão adicionados 100 µL de amostra à solução de reação, que consistirá em 100µL de uma solução de EDTA 30 mM; 100µL de uma solução 3 mM de hipoxantina e 200 µL de uma solução 1,42 mM de Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Após, a mistura será mantida a temperatura ambiente por três minutos e, em seguida, adicionado 100 µL de uma solução de xantina oxidase com concentração 0,75 U/mL completando-se o volume até 3mL com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). A solução final será então incubada em temperatura ambiente por 40 minutos e a absorbância medida em espectrofotômetro em 560 nm. A atividade de sequestro do radical superóxido será calculada utilizando a equação 2:

$$O_2^{\cdot-} \text{ atividade antioxidante (\%)} = \left[1 - \frac{(S - S_B)}{(C - C_B)} \right] \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Onde S, SB, C e CB são as absorbâncias da amostra, do branco da amostra, do controle e do branco do controle, respectivamente.

MÉTODO DO RADICAL HIDROXIL (OH•)

A atividade antirradicalar das amostras em estudo e dos padrões analíticos em diferentes concentrações frente ao radical hidroxila será avaliada utilizando o método da 2-desoxi-D-ribose. O FeCl₃• 6H₂O e ácido ascórbico serão preparados em água mili-Q antes do uso. Em um tubo, onde ocorrerá a reação serão adicionados 100 µL do extrato, 100 µL de EDTA 1 mM, 100 µL de FeCl₃ • 6H₂O 1 mM, 100 µL de 2-desoxi-d-ribose 36 mM, 100 µL de H₂O₂ 10 mM, e 100µL de ácido L-ascórbico 1 mM em tampão fosfato 25 mM (pH 7,4). Após isto, o volume será completado até 1,0 ml com tampão fosfato. Em seguida, a solução será incubada a 37°C durante 1 h, sendo a reação interrompida pela adição de 1,0 mL de TCA a 10% (m /v) e 1,0 mL de 1,0% de TBA (m/v) em tampão fosfato (pH 7,4). A mistura será aquecida a 37°C durante 15 min. Após, as amostras serão resfriadas e o volume final ajustado para 5,0 ml com água deionizada e a absorbância medida em espectrofotômetro em 532 nm. A atividade antioxidante das amostras será calculada de acordo com a equação abaixo:

$$AA_{OH} = \left(1 - \frac{(S - S_B)}{(C - C_B)} \right) \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Onde S, SB, C e CB são as absorbâncias da amostra, do branco da amostra, do controle e do branco do controle, respectivamente.

MÉTODO DO RADICAL PEROXILA (ROO•)

A avaliação da atividade antirradicalar das amostras frente ao ROO• será realizada pelo método fluorimétrico, sendo utilizado diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH₂-DA) como substrato. A atividade antirradicalar contra o radical peroxil (AAROO•) das amostras será determinada com base na medida referente ao tempo de 30 minutos de reação e calculada conforme equação abaixo:

$$AA_{ROO\cdot} = \left(1 - \frac{(F_A - F_{AB})}{(F_S - F_{SB})} \right) \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

Onde FA é a absorbância da amostra, com ABAP, FAB é a absorbância do branco da amostra, sem ABAP, FS é a absorbância do solvente utilizado nas amostras, com ABAP, e FSB é a absorbância do branco do solvente, sem ABAP.

Análise estatística

Os dados serão submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Aqueles que não apresentam normalidade são submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis para as comparações entre as espécies e entre os períodos (seco e chuvoso) para cada estuário, seguido do teste de comparações múltiplas (Teste de Dunn) (ZAR, 2010).

Os parâmetros que apresentarem normalidade serão submetidos ao teste ANOVA, seguido do teste post-hoc Tukey. Nas análises estatísticas básicas será utilizado o Excel ou o Software em Genética e Estatística Experimental (Programa GENES).

Análise de Componentes Principais (PCA) separada por espécie será realizada considerando os períodos chuvoso e seco do ano correspondente, sendo construída por meio de matriz de correlação dos dados (LEGENDRE e LEGENDRE, 1994). Para tal, serão utilizados o programa R (R CORE TEAM, 2021), os pacotes *ggplots* (WICKHAM, 2016), *FactoMineR* (LE et al., 2008), *factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) e *factoInvestigate* (THULEAU E HUSSON, 2020). No geral, considera-se α (alfa) igual a 0,05 como nível de significância estatística para todos os testes.

6.3. Meta 2 - Diagnóstico sobre a fauna do manguezal, compartimento caranguejos

*6.3.1. Avaliação da estrutura e dinâmica populacional dos decápodes da espécie *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi* na foz do Rio Doce e nos manguezais dos estuários dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Mariricu e São Mateus.*

Desenho amostral

Em cada área de estudo, parcelas fixas, denominadas estações de coleta, com aproximadamente 75 m² serão delimitada são longo do gradiente estuarino: estuário inferior (Setor 1), médio (Setor 2) e superior (Setor 3). Em cada setor, as estações serão demarcadas próximo às margens direita e esquerda dos canais mais representativos do estuário. As estações demarcadas nos seus extremos com lacres plásticos numerados, georreferenciadas utilizando o GPS Trimble Juno SA e fotografadas serão monitoradas e mantidas de acordo com a etapa metodológica descrita abaixo.

Em cada estação de coleta, pelo menos 3 quadrados de 5 x 5 metros serão demarcados, as seguintes atividades serão realizadas: contagem das galerias diferenciando-as em abertas, fechadas (indicativo de ecdise) e vazias, identificadas pela ausência de atividades biogênicas (marcas de rastros, dejetos ou movimentação de substrato), para estimativa da densidade de indivíduos (indivíduos/m²); e medição do diâmetro (menor e maior) da abertura de cada galeria, uma vez que estas são elípticas, para auxiliar na avaliação da estrutura populacional. As medições dos diâmetros das galerias serão realizadas com o auxílio de paquímetro de aço (marca Digimess), com precisão de aproximadamente 0,03 mm,

adaptado pela soldagem de prolongamentos em forma de espátula de 10,5 cm de comprimento, 2 cm de largura e 3 a 4 mm de espessura, com base no método descrito por Schmidt et al. (2008). A contagem das galerias permitirá a estimativa da densidade populacional uma vez que cada galeria, aberta ou fechada, é habitada por um indivíduo (SCHMIDT, 2006).

Armadilhas do tipo ratoeiras serão posicionadas aleatoriamente na entrada das galerias para a captura de *C. guanhumí*. Cada exemplar terá seu sexo identificado por dimorfismo sexual externo (formato do abdômen) (MELO, 1996) e condição de vida anotado para determinação da razão sexual e para avaliação do período de reprodução. Estes exemplares serão coletados por catadores profissionais e terão seu comprimento e largura aferidos por meio de paquímetro digital (sem adaptação) da marca Digimess, com precisão de aproximadamente 0,03 mm, posicionado sobre a superfície dorsal da carapaça. Os indivíduos serão liberados no próprio local de captura logo após as medições. A técnica empregada nesta etapa será de captura e solta. Durante as expedições, exemplares aleatórios de *U. cordatus* serão capturados por catadores profissionais através da técnica conhecida como braceamento para identificação do sexo e medição do cefalotórax. Todas as amostragens serão semestrais (período chuvoso e seco) e em eventos estocásticos.

Durante o período reprodutivo, dez fêmeas ovígeras de *U. cordatus* serão coletadas nos estuários dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim e São Mateus e de *C. guanhumí* apenas na foz do Rio Doce por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção. Os exemplares serão transportados em sacos de estopa até o laboratório de Ecologia do Ecossistema Manguezal, localizado na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus São Mateus, para posteriores análises e tombamento das espécies no acervo do projeto.

Procedimentos em laboratório

As fêmeas ovígeras serão lavadas para retirar o excesso de sedimento e, em seguida, as medições biométricas (comprimento e largura do cefalotórax) realizadas. Os indivíduos com a massa ovígera serão pesados em balança de alta precisão (modelo AL500C da marca Marte) com precisão de 0,001 g. Após este processo, preservados em solução diluída contendo 90% de água destilada e 10% de formaldeído. Posteriormente, ocorrerá a raspagem da massa ovígera presa nos pleópodes e as seguintes informações serão obtidas: (1) peso total (g); (2) peso da subamostra em gramas (g); e (3) contagem de ovos, por unidade, da massa ovígera de cada fêmea. O seguinte procedimento será realizado para estimar o número de ovos por fêmea: para cada indivíduo uma subamostra de aproximadamente 2,5 g/ml de massa ovígera será retirada e fotografada. Após este procedimento, o material será colocado em placa de Petri, pesado e separado com o auxílio de duas pinças para a separação total dos ovos presos aos filamentos.

A separação e a análise do número de ovos por massa ovígera serão feitas utilizando-se o estereoscópio óptico (marca Nikon, modelo Leica M80). Após a separação, a massa será fotografada com câmera digital (modelo LEICA EZ câmera 2.6.0). A escala das fotografias será determinada pelo programa de aquisição de imagens LAS EZ 3.0.0, instalado em computador acoplado ao estereoscópio e o ajuste realizado de acordo com o aumento empregado pela objetiva selecionada

para a visualização da imagem no estereoscópico. As imagens digitais adquiridas serão transferidas para o programa Paint (Microsoft®) para facilitar a contagem dos ovos da amostra. Posteriormente, o número de ovos será extrapolado para determinar o número total por fêmea, de acordo com o volume total de ovos avaliados por indivíduo. Todos os exemplares serão devidamente etiquetados com as seguintes informações: espécie coletada; local de captura; data da coleta; tipo de maré; fase lunar; e nome do catador responsável pela coleta.

Análises estatísticas

DENSIDADE POPULACIONAL, LARGURA DE CEFALOTÓRAX E VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A densidade populacional (indivíduos/m²) em cada unidade amostra (n = 3) será obtida considerando-se as contagens de galerias habitadas (tapadas e abertas) registradas. O menor diâmetro das galerias será empregado para estimar o tamanho dos indivíduos de *U. cordatus*, uma vez que este possui melhor correlação com o comprimento do cefalotórax do caranguejo devido ao hábito da espécie entrar de lado na galeria (SCHMIDT et al., 2008). A estimativa será obtida pela conversão do valor do menor diâmetro da galeria em comprimento de cefalotórax (Equação 1) e, posteriormente, em largura (Equação 2), por meio das equações lineares propostas por Schmidt et al. (2008), sendo elas:

Abertura da galeria

$$\text{Diâmetro menor} = 0,36 + 1,04 * CC \text{ (Equação 1)}$$

Comprimento do cefalotórax

$$LC = -0,05 + 1,30 * CC \text{ (Equação 2)}$$

Onde, CC (mm) corresponde ao comprimento e LC (mm), a largura do cefalotórax, ambos em unidade de milímetros.

O teste de Shapiro-Wilk e Bartlett serão utilizados para verificar normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Os dados serão transformados (log + 1) quando não apresentarem distribuição normal ou variâncias homogêneas. A ANOVA unifatorial será aplicada para verificar diferenças entre a densidade populacional de *U. cordatus* entre os estuários em cada período (chuvoso e seco) e entre os períodos em cada estuário. A densidade entre os tipos de bosques (*Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*) será avaliada através do teste T quando os dados apresentarem distribuição normal e variância homogênea, o teste de Mann-Whitney será executado quando não atenderem as essas premissas. Quando possível, a ANOVA bifatorial será aplicada para verificar diferenças entre a densidade populacional de *U. cordatus*, variável dependente, em bosques de *R. mangle* e *L. racemosa*. Tipo de bosque, considerando a espécie vegetal dominante, e período (chuvoso e seco) serão os fatores. As mesmas análises estatísticas serão aplicadas para a variável dependente largura do cefalotórax (mm). Quando os dados não apresentarem distribuição normal mesmo após a transformação, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o *pós-hoc* de Comparações Múltiplas de Dunn serão utilizados. As referências utilizadas nestas análises serão Gotelli e Ellison (2013) e Zar (2010).

Para *C. guanhumi*, ANOVA unifatorial será aplicada para avaliar a diferença da densidade de indivíduos entre os períodos em cada estuário. A análise de normalidade dos resíduos também será realizada através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados serão transformados ($\log + 1$) quando não atenderem as premissas para aplicar ANOVA paramétrica (Teste F), e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Após a transformação, ao não atenderem novamente as premissas, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o de comparações múltiplas de Dunn serão utilizados.

Histogramas da distribuição de frequência das classes de tamanho (mm) para *U. cordatus*, por período chuvoso e seco, serão elaborados a partir das estimativas do tamanho dos indivíduos ocupando cada galeria para cada estuário. Para *C. guanhumi*, os histogramas serão elaborados com base nos valores de largura do cefalotórax dos indivíduos capturados e medidos em campo.

A razão sexual será estimada para as duas espécies, em cada estuário, nos períodos chuvoso e seco e o teste do Qui-quadrado (X^2) aplicado para avaliar diferenças significativas na frequência de distribuição de machos e fêmeas em relação ao esperado (1:1). Para fins de inferência, adotou-se nível de significância de 5% (ZAR, 2010).

Para a realização das análises multivariadas de componentes principais (PCA = *Principal Component Analysis*), o procedimento segundo Gotelli e Ellison (2013) com representação gráfica *biplot* (HOTELLING, 1933; CRUZ e CARNEIRO, 2006) será utilizado. A PCA será empregada para cada período (chuvoso e seco) considerando os parâmetros populacionais (densidade e largura do cefalotórax), granulometria (frações areia e lama em %), teor de matéria orgânica (%) e carbonato de cálcio CaCO_3 (%) no sedimento, concentração de metais no sedimento (Alumínio, Cromo, Cobre, Ferro, Manganês, Chumbo, e Zinco em mg/kg) e micronutrientes foliar (Alumínio, Cobre, Ferro, Manganês, Chumbo e Zinco em mg/kg). Os valores de cada variável serão inicialmente padronizados pela equação $Z = (Y_i - \bar{Y})/s$ em que Z representa o valor padronizado adimensional, Y_i corresponde ao valor da amostra i para a variável original Y, e $\bar{Y}$ e s representam sua média e desvio padrão respectivamente. A Distância Euclidiana será usada como medida de dissimilaridade e a representação da variabilidade em gráfico bidimensional com base nos dois primeiros componentes principais. Análise de correlação de Pearson também será realizada entre os parâmetros populacionais e concentração de metais no sedimento e micronutrientes foliar. Esta e as demais análises serão executadas no programa R (R CORE TEAM, 2021).

Fecundidade

A fecundidade será estimada por meio da expressão proposta por Ogawa e Rocha (1976) descrita abaixo:

$$F = N * (P/PS) \text{ (Equação 3)}$$

onde: F = fecundidade individual; N = número de ovos da subamostra; P = peso total da massa de ovos (g); e PS = peso da subamostra (g).

A análise de covariância (ANCOVA) será realizada para comparar a fecundidade entre os estuários e entre os períodos reprodutivos. A distribuição dos resíduos e a homogeneidade das variâncias serão

verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk de Levene, respectivamente (ZAR, 2010). Os valores de F e LC médio das fêmeas ovígeras do estuário do rio São Mateus serão comparados com aqueles encontrados por Porto et al. (2021), em 2015 e 2016, pela análise de covariância (ANCOVA). Análises de correlações serão realizadas para verificar a relação entre F e LC, F e peso total da fêmea (PM).

6.3.2. Mapeamento dos habitats das espécies de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi* nos manguezais dos estuários dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Mariricu, São Mateus e na foz do Rio Doce

A áreas de distribuição de *U. cordatus* e *C. guanhumi* nos estuários serão representadas graficamente. Cada estação de coleta terá quatro (4) coordenadas geográficas no mínimo obtidas através de um GPS Trimble de pós-processamento. Com essas coordenadas, a distância entre parcelas e a distância das parcelas ao ponto mais próximo geodésico (levantamento preciso por RTK) será estimada.

Imagens de Satélite das áreas de estudo em formato digital (CD-ROM), imagens Landsat TM, para identificação das áreas a serem mapeadas em contexto geral (imagens Landsat TM gratuitas) vão permitir gerar uma base em escala média para visualização de todas as áreas simultaneamente. Imagens de alta resolução (uma imagem ao ano para cada área de estudo), correspondentes às bandas multiespectrais (1 a 3), e infravermelho próximo (4) serão georreferenciadas e corrigidas geometricamente pelo algoritmo de interpolação de filtragem convolução cúbica (ortorretificada e georreferenciada) pela própria empresa que fornece. Para verificar a precisão desse georreferenciamento, uma base de contornos vetoriais de área de estudo no formato shapefile (*.shp) será sobreposta a uma das bandas adquiridas. Arquivos *shapefile* serão gerados a partir da utilização de GPS pós-processado da Trimble por caminhamento (linhas, pontos e áreas).

O Sistema de Informações Geográficas SPRING® (INPE) será utilizado para manipulação e tratamento das imagens, empregando diferentes algoritmos de composição, suavização, tratamento de contraste, filtragem, mosaicagem e demais processamentos complementares de imagem e segmentação. Inicialmente a segmentação da imagem, empregando-se os algoritmos de classificação por regiões, será realizada. Depois da avaliação dos resultados, iniciará o processo de classificação supervisionada por pixel, para efeito comparativo.

Os arquivos resultantes das etapas de processamento serão incorporados ao SIG ArcGIS® (ESRI) para a representação final do processo de classificação supervisionada dos ambientes vegetacionais e geração das grades que poderiam representar de modo filigranado a variabilidade de ambientes frequentados pela fauna estudada. O mapeamento das unidades da paisagem será realizado no SIG ArcGIS® (ESRI). O Banco de Dados Georreferenciado será implementado no SIG ArcGIS® (ESRI) e a leitura das regiões realizadas por meio da grade de pontos de coleta amostrados durante o monitoramento (tabela de dados em formato MS Excel® convertida para arquivo em formato shapefile).

A produção de mapas temáticos incorporará os dados tabulares de pontos amostrais e respectivos valores de parâmetros ambientais e densidade dos caranguejos, juntamente com as imagens em formato GeoTIFF.

6.4. Meta 3 - Diagnóstico de contaminação da vegetação por metais dos manguezais de Aracruz (Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim), Barra Nova (Rio Mariricu) e Conceição da Barra (Rio São Mateus)

As avaliações presentes neste tópico são referentes a meta 3.

Material Vegetal e condições de Amostragem - será avaliada inicialmente a espécie *R. mangle* que já se detém o protocolo de cultivo hidropônico e é a espécie mais abundante nos manguezais do estado do Espírito Santo.

Descrição dos Experimentos

Experimentos in situ de Variabilidade Espacial: O experimento será conduzido em três áreas de manguezal no norte do Espírito Santo e na foz do Rio Doce.

Para a análise de metais, as amostras deverão ser coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5 cm) da amostra de sedimento, obtendo-se assim apenas o sedimento superficial. Para cada amostra, deverão ser coletados aproximadamente 50 g de sedimentos, os quais serão armazenados em pote plástico e mantidos congelados até o momento das análises. Os seguintes metais serão avaliados no sedimento: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

Para caracterização dos ambientes sedimentares e de possíveis fatores de influência sobre a distribuição espacial dos metais, a quantificação do conteúdo de matéria orgânica (MO) será realizada de acordo com o método da perda por ignição (450 °C por 5h), enquanto o conteúdo de sedimentos finos (argila e silte) será determinado após peneiramento em malha de 63 micrômetros, com posterior secagem das amostras (50 °C por 72h).

6.4.1. Cultivo ex situ

Coleta de propágulos

Os propágulos de *R. mangle* serão coletados em diferentes indivíduos adultos no manguezal da Guaxindiba, região localizada foz natural do rio Itaúnas por esforço intensivo nas duas margens do rio. Após a coleta, os propágulos serão transportados para o laboratório de Ecologia do Ecossistema Manguezal (CEUNES/UFES) para serem triados. Os propágulos coletados serão lavados em água corrente com detergente neutro para retirar resíduos de lama e areia, bem como micro-organismos, após a lavagem, serão numerados aleatoriamente para acompanhamento individual durante as diferentes etapas deste projeto. Na sequência, os propágulos passarão por um processo de assepsia pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% durante 10 minutos seguido de tríplice enxágue. Após a assepsia, será mensurado o comprimento por meio de trena calibrada e peso fresco (g) aferido em balança analítica com precisão de 0,001g. Após esta etapa apenas os indivíduos sem avarias serão selecionados para implantação de todo o experimento.

Implantação dos experimentos

Os propágulos serão cultivados durante três meses em casa de vegetação situada no campus da UFES em São Mateus (CEUNES), em recipientes (vasos) plásticos tendo como substrato solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada seguindo o protocolo definido por Tognella et al. (2019). Após este período será realizada a troca da solução onde será realizada a inserção do Fe e do Mn para implementação dos tratamentos. As concentrações a serem definidas com auxílio da literatura e a partir dos dados coletados em campo.

O delineamento experimental será em blocos casualizados (DBC), distribuídos em cinco tratamentos (controle mais quatro concentrações distintas), com sete repetições por concentração, resultando em 35 parcelas experimentais. Serão monitorados mensalmente os parâmetros morfológicos e fisiológicos e ao final do experimento serão analisados concentração de metais nos diferentes compartimentos das plântulas, concentração de pigmentos e área foliar. A aquisição destes parâmetros será realizada apenas ao final pois se tratam de processos destrutivos.

A partir dos resultados obtidos neste experimento será realizado um novo cultivo visando avaliar efeito do sinergismo entre o Fe e Mn nas plântulas de *R. mangle*.

Parâmetros morfológicos

O comprimento do epicótilo das plântulas será obtido individualmente com o auxílio de paquímetro digital (King Tools $\pm 0,01\text{mm}$). A referência para manter o ponto zero de medição será a marca da transição entre o hipocótilo e epicótilo e, a partir deste, até o ápice da maior ramificação.

A cada monitoramento o número de folhas será obtido por contagem manual e individual em cada plântula partindo do epicótilo em direção ao hipocótilo.

Ao final do experimento serão calculadas a taxa de crescimento (TC) que é calculada pela fórmula: $TC = \Delta C / \Delta T$. Onde ΔC corresponde à variação da altura (em cm) e ΔT (tempo em dias) refere-se ao intervalo entre as observações. A taxa de crescimento relativo (TCR), diferentemente da TC, leva em consideração o peso dos indivíduos, sendo balizada como: $TCR = [(\ln Ps1 - \ln Ps2) / (Ti - Tf)]$; onde Ps1 e Ps2 correspondem, respectivamente, ao peso seco em gramas do indivíduo no início e ao final do experimento, isto é, em Ti e Tf (MCKEE.,1995).

Fluorescência da Clorofila a

Vide ANÁLISES FOTOSINTÉTICAS.

Assimilação de CO₂ e trocas gasosas

Vide ANÁLISES FOTOSINTÉTICAS.

Análise nutricional

Ao final do experimento as plântulas de cada tratamento serão separadas em dois compartimentos, parte aérea e raiz. As amostras serão acondicionadas em sacos de papel identificados de acordo com

cada compartimento e seu respectivo tratamento, serão secas em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante. Em seguida as amostras serão moídas em moinho tipo Wiley (Marca Tecnal; modelo TE650/1) com peneiras de malha 20 e enviadas para a análise química para determinação de macro e micronutrientes. Para a análise nutricional serão considerados os seguintes nutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Co) boro (B), chumbo (Pb) e alumínio (Al).

O N-total será determinado pelo método Kjeldahl, descrito por Bremner (1965). Os demais elementos serão analisados após mineralização pela digestão nítrico-perclórica. O B será determinado colorimetricamente pelo método da Azometina H (WOLF, 1974), após a mineralização por via seca em mufla a 550o C. O P será dosado colorimetricamente pelo método de redução do fosfomolibdato pela vitamina C, de acordo com Braga e Defelipo (1974); o K, por fotometria de emissão de chama; o Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu, por espectrofotometria de absorção atômica; e o S determinado por turbidimetria do sulfato (BLANCHARD et al., 1965).

Análise estatística

Os dados serão submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Aqueles que apresentarem distribuição normal serão submetidos a análise de variância ANOVA One-Way seguida pelo teste de Dunnett a 5% de significância. Os que não apresentarem normalidade serão submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis e ao teste post-hoc de Dunn (ZAR, 2010).

As avaliações temporais referentes ao crescimento e a produção foliar serão analisadas por meio de regressões utilizando os softwares GENES (CRUZ, 2016), BioEstat5.3 (AYRES et al., 2007) e R (R CORE TEAM, 2021).

6.4.2. Caracterização mineralógica dos sedimentos

Coleta das amostras

As amostras de sedimentos serão coletadas semestralmente, nos períodos seco e chuvoso, e em eventos estocástico, na foz do rio Doce e nos manguezais dos estuários dos rios Piraquê-Açu, Piraquê-Mirim, Mariricu e São Mateus. A coleta será realizada na profundidade 0-5 cm auxílio de coletores constituídos por um tubo de PVC de 50 cm. Após a coleta, as amostras serão acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e mantidos em temperatura controlada. Após o campo as amostras serão levadas para o laboratório onde serão armazenadas sob refrigeração a 10° C negativos.

Granulometria

Para a análise granulométrica serão utilizados 50 gramas de amostra bruta. Primeiramente, será realizada uma tríplex lavagem das amostras com água para a retirada dos sais por meio da técnica de decantação em Becker de 1 L. Posteriormente será realizada a separação das frações grossa (areia + cascalho) e fina (silte + argila), na qual procede-se colocando a amostra lavada em peneira com abertura igual a 63 µm sob água corrente.

O recipiente contendo a fração fina ficará em repouso até completa deposição do sedimento em suspensão. Após a decantação, o excesso de água será drenado cuidadosamente com uma mangueira e a amostra seguirá para remoção da matéria orgânica total por queima com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à 30%, esta queima consiste na adição de H_2O_2 sobre a amostra sob chapa aquecedora por cerca de 6h até a digestão completa da matéria orgânica. Após a queima será realizado um triplice enxague da amostra. Após a separação, a fração fina (lama) será analisada empregando-se o granulômetro a laser, Mastersizer 2000 da Malvern Instruments de acordo com a metodologia adaptada de Dias (2004).

A fração grossa será levada à estufa a 40°C para secagem. Após seco, o sedimento será pesado e seguirá para o fracionamento via seca. A fração areia será passada pelo peneiramento a seco, que consiste em utilizar conjunto de peneiras com telas de malhas de 2 mm a 0,063 mm colocadas em um agitador mecânico durante 15 minutos. Após peneiramento cada porção do sedimento de acordo com sua granulometria será pesado e planilhado. Será utilizada a escala granulométrica de Wentworth (1922), em que as frações maiores que 0,063 mm são classificadas como areias/grânulos e as menores, como silte/argila (SUGUIO, 1973).

Matéria Orgânica

O teor de matéria orgânica (MO) presente nos sedimentos será mensurado por meio do método de calcinação, que consiste na queima da MO em altas temperaturas. Para isso, serão utilizados 2 g de cada amostra de sedimento. Essas amostras serão acondicionadas em cadinhos de porcelana e serão submetidas à temperatura de 450 °C na mufla, durante 4 horas. A massa de MO é definida pelo peso do sedimento antes da queima na mufla subtraído do peso após a queima segundo método modificado Goldin (1987). O teor é a conversão deste valor em porcentagem, podendo-se encontrar a concentração de MO presente nas amostras por meio do cálculo:

$$MOT = \frac{Pf \times 100}{Pi}$$

Onde Pf é o peso final e Pi é o peso inicial das amostras.

Carbonato de Cálcio

Para a determinação do carbonato de cálcio serão utilizados 20 g de amostra. As amostras serão liofilizadas, após este processo será realizada a queima do carbonato por meio da adição lenta e gradual de HCl (30%). O procedimento continua até que a adição de HCl não provoque mais reação (borbulhamento). Terminada a queima do carbonato, o sedimento será lavado três vezes com água e seco em estufa à 40 °C. Após seco, o Becker com o sedimento será novamente pesado e o teor de carbonato de cálcio será calculado pelo peso sedimento pré-queima subtraído pelo peso do sedimento pós-queima corrigido para porcentagem, conforme método primeiramente reportado por Gross (1971).

Metais

A análise da concentração de metais nos sedimentos será realizada segundo método US EPA 3051A (USEPA, 2013), que preconiza a digestão de cerca de 0,50 g de solo, seco e homogeneizado, em 10 mL de HNO₃ em tubos de Teflon com o uso do forno micro-ondas (CEM, MARX X-PRESS) seguindo os seguintes parâmetros: 1ª rampa de temperatura 25°C a 175°C em 5:30min. e a 2ª rampa de 25°C a 175°C em 4:30min., ambas em potência de 1600 W. A solução foi então resfriada e filtrada utilizando o filtro Whatman nº 1 e diluída para 100 ml num balão volumétrico e as soluções analisadas pelo ICP - MS (Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada; Agilent, CX7500). Os elementos analisados pelo ICP-MS serão: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V e Zn. Material de referência (SS-2, Enviro MATTM) será analisado para certificação do método e porcentagens de recuperação desses elementos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.C.Z.; JABLONSKI, S. Conservation of Marine and Coastal Biodiversity in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, p. 625–63, 2005.

ARAR, E.J. Method 447.0 - Determination of Chlorophylls a and b and Identification of Other Pigments of Interest in Marine and Freshwater Algae Using High Performance Liquid Chromatography with Visible Wavelength Detection. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1997.

AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM.364p, 2007.

BLANCHARD, R.W.; REHM, G.; CALDWELL, A.C. Sulfur in plant material by digestion with nitric and perchloric acid. **Proceedings Soil Science Society of America**, v. 29. p. 71-72, 1965.

BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista do Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.

BRASIL. Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. Diário oficial: Poder executivo. Decreto, 2005.

BREMNER, J.M. Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in the series Agronomy. **American Society of Agronomy**, Inc., Publisher USA, p.1149-1178, 1965.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, v. 2, 2006.

MELO, G.A.S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro.** Editora Plêiade; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 1996.

DIAS, J.A. Análise textural. In: DIAS, J.A. **A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos.** Ed. preliminar. Algarve, 2004.

FALQUETO, A.R.; SILVA, D.M.; FONTES, R.V. Photosynthetic performance of mangroves *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under field conditions. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 577-582, 2008.

GOLDIN, A. Reassessing the use of loss-on-ignition for estimating organic matter content in noncalcareous soils. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.*, 18:1111-1116, 1987.

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **A primer of Ecological Statistics.** 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates. 579 p. 2013.

GROSS, M.G. Carbon determination. In: CARVER, R.E. (ed.) **Procedure in sedimentary petrology.** New York: Wiley-Interscience. Cap.25, p. 573-596, 1971.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit), 1950.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of educational psychology**, v. 24, n. 6, p. 417, 1933.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses.** R Package Version 1.0.5 (WWW Document). 2017.
<https://CRAN.Rproject.org/package=factoextra>.

LE, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology.** Elsevier, Amsterdam, 1994.

MCKEE, K.L. Interspecific variation in growth, biomass partitioning, and defensive characteristics of neotropical mangrove seedlings: response to light and nutrient availability. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 3, p. 299-307, 1995.

OGAWA, E.F.; ROCHA, C.A.S. **Sobre a fecundidade de crustáceos decápodes marinhos do Estado do Ceará, Brasil.** 1976.

OGAWA, E.F.; ROCHA, C.A.S. Sobre a fecundidade de crustáceos decápodes marinhos do Estado do Ceará, Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar. Fortaleza*, v. 16, n.2, p. 101-104, 1976.

PORTO, L.A.; TOGNELLA, M.M.P.; LIMA, K.O.O. Fecundidade de *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (CRUSTACEA: DECAPODA: BRACHYURA) no Norte do Espírito Santo, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 37, p. 252-267, 2021.

R CORE TEAM. **R: A Language and an Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2021.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. EVOLUÇÃO ESPAÇO TEMPORAL NA QUALIDADE AMBIENTAL E NA BIODIVERSIDADE NO AMBIENTE COSTEIRO. RT-39C, *Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia*. 349 pag. 2022.

SCHMIDT, A. J. **Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea-Decapoda-Brachyura), e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SCHMIDT, A.J.; OLIVEIRA, M.A.; SOUZA, E.P.; MAY, M.; BRITO, S.M. Relação entre abertura de galeria e comprimento de cefalotórax do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea-Decapoda-Brachyura). **Boletim Técnico Científico. CEPENE, Tamandaré**, v. 16, n. 1, p. 56-58, 2008.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and PhotoBiology**, v. 104, n. 1–2, 2011.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL M.; SRIVASTAVA A. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. – In: PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE (ed.): **Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration**. Springer, Dordrecht, p. 321-362, 2004.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. São Paulo: Edgard Blücher, EDUSP, 318 p. 1973.

THULEAU, S.; HUSSON, F. **FactoInvestigate: Automatic Description of Factorial Analysis**. R package version 1.7 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=FactoInvestigate>.

TOGNELLA, M.M.P ; BARCELOS, A.P.L.G., BARCELOS, U.D; FILLMANN. G.; FERNANDES, A.A; FALQUETO A.R; AMORIM, K.S.P; SANDRINI, M. Protocolo para cultivo de espécies de manguezal. Editora Atenas, Ponta grossa, p. 153-166 , 2019. DOI: 10.22533/at.ed.481190907411

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, soils and Oils**. (Technical Resource Document, EPA SW-846/3052). 2013.

WELLBURN, A.R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994.

WENTWORTH, C.K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **Journal of Geology**, v. 30, p. 377-392, 1922.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag, New York, 2016.

WOLF, B. Improvements in the azomethine-H method for determination of boron. Comm. **Soil Science and Plant Analysis**, v. 5, p. 39-44, 1974.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 5th Ed. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, N. Jersey, 944 p. 2010.

ANEXO

AMBIENTE MARINHO

SUMÁRIO

SUMÁRIO EXECUTIVO - AMBIENTE MARINHO.....	205
MODELAGEM NUMÉRICA	208
SEDIMENTAÇÃO COSTEIRA.....	220
SEDIMENTAÇÃO MARINHA	232
HIDROGEOQUÍMICA MARINHA	242
FITOPLÂNCTON	254
ZOOPLÂNCTON.....	267
ICTIOPLÂNCTON.....	271
BENTOS DE SUBSTRATO INCONSOLIDADO.....	280
FUNDOS RECIFAIS E BANCOS DE RODOLITOS	289
PEIXES E CRUSTÁCEOS MARINHOS	306
TARTARUGAS MARINHAS.....	333
CETÁCEOS	349
AVES MARINHAS	362
MONITORAMENTO REMOTO DA MEGAFauna MARINHA.....	380

SUMÁRIO EXECUTIVO - AMBIENTE MARINHO

O Ambiente Marinho do PMBA, formado por 14 temas, tem registrado evidências de que o efeito do rejeito de mineração da barragem de Fundão (Mariana/MG) ainda é presente na região da plataforma continental que está sob a influência do rio Doce. Essas evidências permeiam tanto os compartimentos abióticos quanto bióticos da região marinha e são congruentes quanto as conclusões sobre o efeito do rejeito de mineração. O conjunto de temas aqui tratado é parte do PMBA, e faz tríade com o ambiente dulcícola e costeiro, compondo os elementos de síntese dos processos ecossistêmicos regionais da bacia do Baixo Rio Doce e região costeira e marinha adjacente. Os temas e processos relacionados que compõe o Ambiente Marinho, entretanto, interagem internamente no contexto marinho antes de ter influência com outros Ambientes. Por isso, justifica-se a separação desses temas dentro do ambiente marinho.

Os ecossistemas marinhos são moldados pelos resultados da interação dos componentes abióticos e bióticos. Os componentes abióticos possuem em sua base elementos físicos, químicos e geológicos, os quais são a base para a descrição do ambiente no qual a biota habita e se relaciona. Os componentes abióticos do Ambiente Marinho, no PMBA, pode ser rudimentarmente dividido em dois compartimentos: água e sedimento. A descrição dos compartimentos água e sedimento é, primeiramente, realizado no tema Hidrogeoquímica Marinha (metais, nutrientes e orgânicos). A dinâmica dessas variáveis na água, por sua vez, é influenciada por processos físicos e é avaliada pelo tema Modelagem Numérica. A dinâmica desses elementos no compartimento água prevê interação direta com o compartimento sedimento. Assim, os temas Sedimentação Marinha e Sedimentação Costeira procuram entender os processos de aporte, dispersão e sedimentação nas áreas de estudo, bem como mapear como esses processos moldam o fundo marinho.

Com este plano de fundo abiótico é possível compreender os processos que direcionam as comunidades bióticas dos ambientes marinhos. Os temas relacionados a biodiversidade no Ambiente Marinho contemplam produtores primários a grandes vertebrados, de modo a avaliar o efeito do rejeito de mineração em diversos níveis tróficos. Na base da cadeia trófica, o tema Fitoplâncton avalia os principais produtores primários dos ambientes marinhos, que suporta a diversidade e biomassa de outros grupos da cadeia trófica, como os avaliados nos temas Zooplâncton e Ictioplâncton. Além dos temas que avaliarão o plâncton, outros temas completarão o monitoramento da teia trófica, avaliando grupos de maior tamanho, como é o caso do tema Bentos de Substrato Inconsolidado, tema Fundos Recifais e Banco de Rodólitos; tema Peixes e Crustáceos Marinhos, tema Tartarugas Marinhas, tema Aves Marinhas e tema Cetáceos. Ainda, toda distribuição e movimentação da megafauna marinha que ocupa a área sob influência da pluma de sedimentos do rio Doce será monitorada pelo tema Monitoramento Remoto da Megafauna Marinha.

Todos os temas dentro do Ambiente Marinho convergem para o mesmo objetivo: entender a dinâmica espaço-temporal da biodiversidade aquática e os fatores direcionadores dessas dinâmicas, visando avaliar a evolução das consequências do aporte de rejeito de mineração da barragem de Fundão.

Entretanto, o Ambiente Marinho é altamente heterogêneo em relação aos objetos de estudo dos temas que o constituem, sendo então necessário estabelecer diferentes recortes espaciais e temporais na amostragem de acordo com as especificidades dos temas monitorados. De forma geral, o Ambiente Marinho será monitorado desde a região de Itapemirim (ES) até a região de Abrolhos (BA), com foco amostral na região entre a APA Costa das Algas e Itaúnas (ES).

O delineamento e a frequência amostral foram definidos como sendo os mesmos para o maior número de temas possíveis para permitir melhor integração dos dados. Considerando esse esforço, os temas Modelagem Numérica, Sedimentação Marinha, Hidrogeoquímica Marinha, Fitoplâncton, Zooplâncton, Ictioplâncton e Bentos de Substrato Inconsolidado serão coletados nas mesmas 42 estações amostrais no Espírito Santo (entre APA Costa das Algas/Aracruz a Itaúnas/Conceição da Barra), com campanhas trimestrais ocorrendo de forma síncrona. Algumas metas desses temas, pela natureza dos estudos e/ou acompanhamento de outros temas, terão frequência e estações amostrais diferentes. Modelagem numérica monitorará dois fundeios na região próxima a foz, com coletas mensais para obtenção dos dados registrados. Fitoplâncton terá, adicionalmente à coleta integrada supracitada, coletas semestrais na região de Abrolhos (BA) em sincronia com o tema Fundos Recifais e Banco de Rodolitos. O tema Sedimentação Costeira acompanhará as coletas trimestrais da campanha integrada, porém monitorando as áreas dos Recifes Esquecidos (ES) e APA Costa das Algas (ES). O tema Sedimentação Marinha, além das campanhas síncronas, fará o mapeamento do fundo da região entre Foz do rio Doce (ES) e APA Costa das Algas (ES), com campanhas mensais até a finalização da área proposta.

Considerando a localização restrita e funcionamento distinto das demais regiões monitoradas no Ambiente Marinho, o tema Fundos Recifais e Banco de Rodolitos realizará o monitoramento desses ecossistemas com frequência semestral em quatro regiões: Abrolhos e Adjacência (BA), Recifes Esquecidos (ES), Foz do rio Doce (ES) e APA Costa das Algas (ES).

Os temas que lidam com crustáceos e vertebrados, por conta da sua natureza comportamental e área de abrangência distintas desses grupos, possuem cada um uma frequência amostral e área de monitoramento distinta. O monitoramento dos organismos estuarinos/marinho do tema Peixes e Crustáceos Marinhos será realizada mensalmente, entre Itaúnas (ES) e APA Costa das Algas (ES), enquanto os organismos recifais/marinhos serão monitorados com a mesma frequência entre a APA de Setiba (ES) e Abrolhos (BA). Por último, neste mesmo tema, a microquímica de otólitos será monitorada de São Mateus até Itapemirim.

O tema Tartarugas Marinhas realizará monitoramento anual, ao longo de 4 meses, entre Aracruz (ES) e Camaçari (BA). O tema Cetáceos, diferente dos demais, possui frequência oportunística, e coletará de acordo com os eventos de encalhe ao longo de todo o litoral do ES. A frequência do tema Aves Marinhas será específica de cada espécie, sendo que a malha amostral varia de Vila Velha (ES) a Abrolhos (BA), na região marinha e de Aracruz (ES) a Linhares (ES) nas praias. Por fim, o tema Monitoramento remoto da Megafauna Marinha acompanhará a frequência trimestral, desde a APA Costa das Algas (ES) até Itaúnas (ES), de forma a atuar de forma síncrona com outros projetos

Para subsidiar ações de conservação, reparação, restauração e manejo da biodiversidade aquática é

necessária a análise integrada de forma sistematizada buscando as principais tendências espaço-temporais do ecossistema marinho, identificando sincronia entre as variações das comunidades bióticas e suas forçantes ambientais. Dessa forma é possível entender o comportamento dos processos ecossistêmicos frente aos impactos ocorridos, permitindo inferências sobre acontecimentos futuros. Somente com a integração dos temas será possível entender esses conjuntos de processos circunscritos dentro de um mesmo ambiente, o marinho.

As particularidades de cada tema serão apresentadas nos planos de trabalho a seguir, onde será observado que a obtenção de dados abióticos são comuns aos temas e sempre serão analisados de forma integrada a fim de discutir as variações sazonais e respostas sobre os parâmetros bióticos.

MODELAGEM NUMÉRICA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Prof. Dr. Renato David Ghisolfi	Coordenador	UFES
Prof. Dra. Susana Beatriz Vinzon	Membro de equipe	UFRJ
Prof. Dr. Marcos Nicolas Gallo	Membro de equipe	UFRJ
DSc. Bruno Borlini Duarte	Técnico vinculado	UFES
Gabriela Corrêa Brasileiro	Pesquisador - CLT	UFES
MSc. Júlia Tavares Salviato	Pesquisador - CLT	UFES
Matheus Andrade	Pesquisador - CLT	UFES
DSc. Sabrina Aparecida Ramos da Fonseca	Pesquisador - CLT	UFES
MSc. Tayná Rosa Martins Paiva	Pesquisador - CLT	UFES
A contratar	Pós-doc	UFES
A contratar	Pós-doc	UFES
Juca Damásio	Iniciação científica	UFES
Thiago Campos Carlos	Iniciação científica	UFES
Schimaili Leandro Barbosa	Iniciação científica	UFES
A contratar	Iniciação científica	UFES
A contratar	Iniciação científica	UFES
A contratar	Iniciação científica	UFES
DSc. Gustavo Vaz de Melo	Pos-doc	UFRJ
DSc. Marcelo Di Lello	Pos-doc	UFRJ
A contratar	Pos-doc	UFRJ
MSc. Diego Luiz Fonseca	Doutorando	UFRJ
Lucas Oliveira	Iniciação científica	UFRJ
Dominique Joelle Silva	Iniciação científica	UFRJ

2. ESCOPO

A compreensão da variabilidade espaço-temporal das forçantes físicas identificadas ao longo do período de execução do PMBA foi fundamental para o entendimento das mudanças nos índices de qualidade da água na região marinha adjacente ao Rio Doce (RRDM, 2019; RRDM, 2020). Os resultados obtidos na primeira fase do monitoramento indicaram a importância da descarga de sedimentos oriundos do rompimento da barragem do Fundão na quantidade e composição dos sedimentos coletados na plataforma continental adjacente. Naturalmente, o impacto maior é observado nas proximidades da foz do Rio Doce, onde o papel da pluma fluvial é determinante na distribuição desses sedimentos. Porém, na dispersão dos rejeitos num prazo temporal maior, atuam outros mecanismos como ondas e correntes na plataforma, geradas principalmente pelo vento, com influência da maré e eventualmente por diferenças de densidade das águas por gradientes térmicos, salinos ou de material particulado em suspensão.

A amplitude desses impactos varia ao longo do ano, principalmente de acordo com o regime de vazão e ondas. No período chuvoso (outubro a março), há maior aporte de material sedimentar à plataforma continental com rejeitos de mineração a ele associado, haja vista que são frequentes eventos hidrológicos na bacia do Rio Doce que acarretam aumentos significativos da vazão fluvial. Uma vez na

plataforma continental, o rejeito de mineração associado ao sedimento é submetido, por exemplo, à atuação de ondas mais energéticas em virtude da passagem de frentes frias na região e à chegada de ondulações remotas (*swell*) durante o período seco (abril a setembro) que também atuam na remobilização do fundo marinho. Então, tanto o material proveniente do aporte fluvial quanto o sedimento ressuspensionado, ficam sob a influência da ação das correntes geradas pela tensão de cisalhamento do vento e das correntes de deriva litorânea geradas pelas ondas (RRDM, 2020).

Nesta segunda fase será dada continuidade à utilização de um modelo numérico costeiro integrado, com resolução adequada para representar os fenômenos relevantes ao transporte de sedimentos finos, tais como as correntes residuais, as tensões de cisalhamento junto ao fundo e os mecanismos de erosão, deposição e transporte da fração fina de sedimentos. Esse modelo será aninhado ao modelo numérico hidrodinâmico já desenvolvido para a região, para que seja avaliada a influência do campo termohalino na pluma de sedimentos. Esforços adicionais também serão realizados para o desenvolvimento de simulações da deriva litorânea, no interior da zona de surfe, pelo menos na região adjacente à foz do Rio Doce.

3. OBJETIVO

A fim de caracterizar a dinâmica da dispersão dos sedimentos provenientes do Rio Doce, os objetivos específicos são: analisar a variabilidade espaço-temporal das forçantes físicas, priorizando tanto as comparações interanuais, bem como ressaltando as semelhanças e as diferenças existentes entre os períodos chuvosos e secos; e caracterizar os mecanismos de transporte dos sedimentos e dos rejeitos, oriundos do rompimento da barragem de Fundão, na região adjacente ao Rio Doce ao longo do período de medições (2019-2022).

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Perfilagem de CTD

A coleta de dados *in situ* é essencial para caracterizar o padrão termohalino e a distribuição espaço-temporal da turbidez na plataforma continental adjacente à foz do Rio Doce. Esses dados também são importantes na validação dos resultados da modelagem numérica hidrodinâmica e de transporte de sedimentos, bem como na integração dos resultados dos demais ambientes que estão sendo monitorados.

META 2 – Fundeios

O posicionamento de 2 (dois) Fundeios em pontos estratégicos possibilita avaliar (mesmo que pontualmente) a dinâmica do sistema oceanográfico através da obtenção de séries temporais de alta

resolução temporal referentes às informações de ondas, correntes e outros parâmetros físico-químicos importantes para compreender o deslocamento da pluma do Rio Doce, bem como sua área de alcance. Esses dados também são necessários para a validação da modelagem numérica hidrodinâmica e de dispersão de sedimentos.

META 3 – Sensoriamento Remoto

As informações obtidas por sensoriamento remoto permitem a compreensão sinóptica da dinâmica do ambiente marinho e a avaliação da distribuição superficial da turbidez oriunda da descarga continental do Rio Doce, bem como o acompanhamento da evolução espaço-temporal das feições térmicas e da produtividade primária. Esses dados também auxiliam na validação dos resultados dos modelos numéricos hidrodinâmico e de transporte de sedimentos.

META 4 – Modelagem numérica hidrodinâmica

O desenvolvimento de experimentos numéricos realísticos e idealizados utilizando o modelo ROMS (*Regional Ocean Modeling System*) possibilita o estudo sinóptico das diferentes variáveis ambientais que conferem alterações diárias e sazonais nos campos termohalinos e de correntes existentes na plataforma continental. Além disso, a modelagem numérica é empregada nos estudos que visam o entendimento dos diferentes padrões de espalhamento da pluma de água proveniente do Rio Doce no ambiente marinho.

Neste trabalho, os resultados do modelo ROMS são utilizados como condições de contorno do modelo Delft3D, que está sendo empregado na realização de experimentos numéricos de dispersão da descarga sedimentar proveniente do Rio Doce, assim como na remobilização e transporte de sedimentos depositados no fundo da plataforma continental.

META 5 – Modelagem numérica de transporte de sedimentos

Os resultados de experimentos numéricos do transporte de sedimentos auxiliam na identificação do destino do material de rejeito no ambiente marinho, apontando os papéis dos diferentes processos físicos atuantes na região costeira e na plataforma continental adjacente ao Rio Doce.

Um modelo costeiro em alta resolução será desenvolvido a partir do aninhamento com os modelos hidrodinâmicos já desenvolvidos para a região. Processos hidrodinâmicos específicos para o transporte de sedimentos finos, como por exemplo tensões de cisalhamento no fundo devido às ondas, transporte devido às ondas, ou correntes residuais de maré ou da circulação gravitacional, serão o foco dessa modelagem. Outro ponto de atenção será a modelagem da deriva litorânea, através do modelo numérico e paramétrico.

Acoplado ao modelo hidrodinâmico, será desenvolvido um modelo do transporte de sedimentos finos. A ênfase dessa modelagem é a dispersão de sedimentos que podem ser oriundos da pluma do Rio

Doce e/ou que estejam já depositados na plataforma continental adjacente, como demonstrado nas medições realizadas.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Temperatura, salinidade, turbidez, fluorescência e oxigênio dissolvido em três profundidades (superfície, meio e fundo) em cada estação amostral; - Séries temporais provenientes do ADCP localizados ao fundo dos dois fundeios (temperatura, elevação do nível do mar, dados de altura significativa, direção e período de pico das ondas medidos junto ao fundo; e dados de velocidade e direção de correntes em três profundidades - superfície, meio e fundo); - Séries temporais provenientes de CTD localizados em superfície e fundo (condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura, clorofila, salinidade e turbidez). - Mapas diários de temperatura, concentração de clorofila-a e de turbidez superficiais; - Campos modelados diários de temperatura, salinidade e velocidade de correntes superficiais.	Renato David Ghisolfi

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Compreensão da variabilidade espaço-temporal das forçantes físicas no padrão de dispersão de sedimentos provenientes do Rio Doce; - Caracterização do padrão termohalino e hidrodinâmico na plataforma continental adjacente à foz do Rio Doce; - Análise da dinâmica dos sedimentos finos na Plataforma Continental Adjacente associada às diferentes forçantes (marés, maré meteorológica, vento local, ondas e circulação gravitacional); - Análise de resultados de modelos de ondas para a deriva litorânea utilizando tanto modelos paramétricos, quanto para cenários específicos com acoplamento de modelo de sedimentos.	Renato David Ghisolfi Susana B. Vinzón Marcos N. Gallo

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência amostral

As coletas de dados por perfilagem da coluna d'água com CTD para obtenção dos parâmetros físico-químicos passarão a ter frequência trimestral em 42 pontos de amostragem, entre a APA Costa das Algas e Itaúnas. Por outro lado, a manutenção dos equipamentos e o resgate de dados de CTD e ADCP nos pontos de fundeio para obtenção dos parâmetros físico-químicos e correntometria continuam realizados em frequência mensal, mas serão reduzidos de 4 para 2 pontos de fundeios.

A Figura 1 e a Figura 2 apresentam a distribuição das estações amostrais e dos pontos de fundeio propostos para o monitoramento do presente Plano de trabalho, considerando as alterações estabelecidas em relação ao atual PMBA, ou seja, a exclusão de 6 estações amostrais em Abrolhos (ABR 01, ABR 02, ABR 03, ABR 04, MUC 01 e MUC 02) e de 2 pontos de fundeio, F1 e F2 localizados na APA Costa das Algas e outro na Foz do Rio Doce, respectivamente. Além disso, serão incluídas 7

estações amostrais distribuídas na região ao norte da Foz do Rio Doce.

Figura 1: Mapa com a localização das estações de monitoramento do Ambiente Marinho que está sendo proposto no presente Plano de Trabalho.

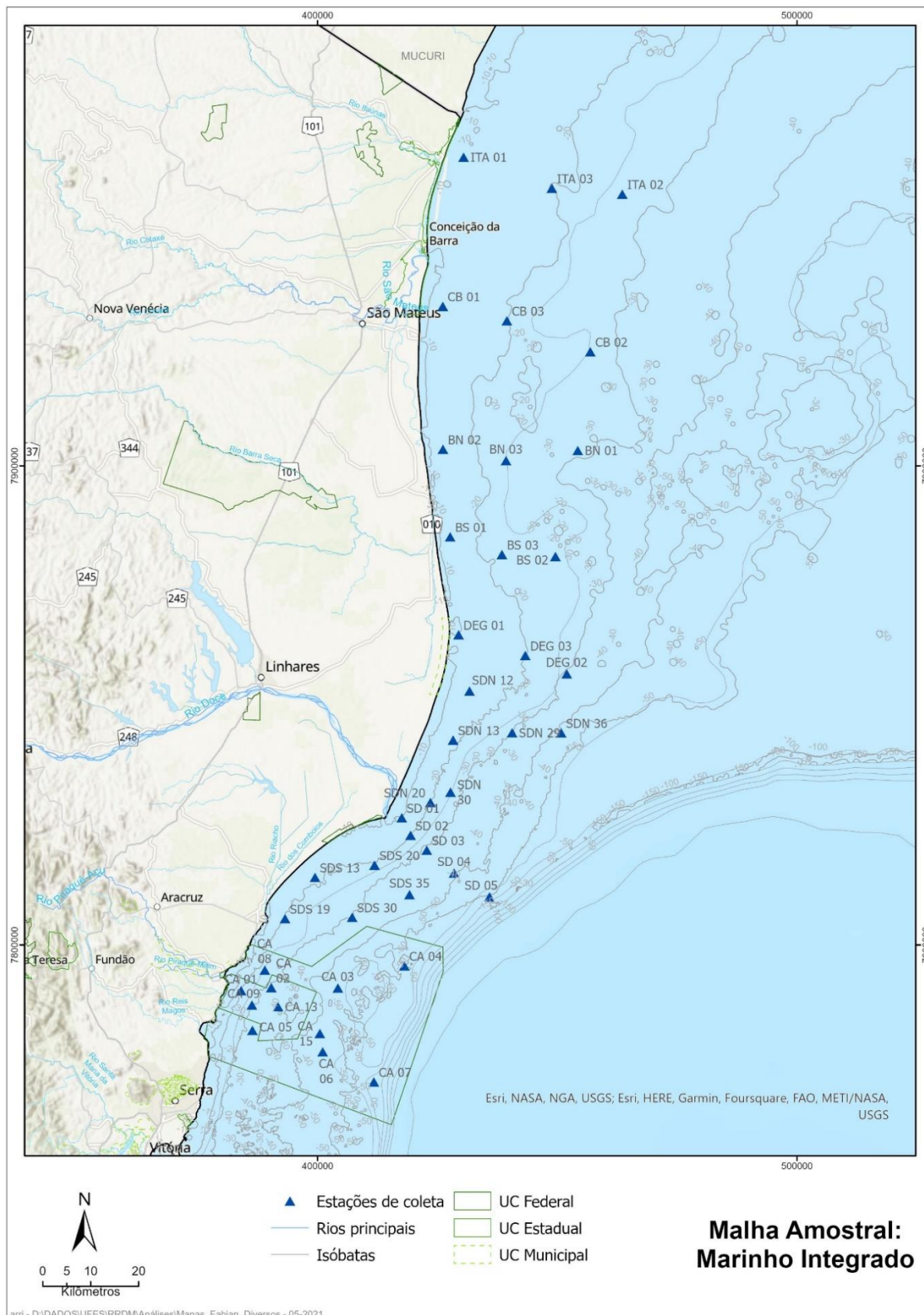
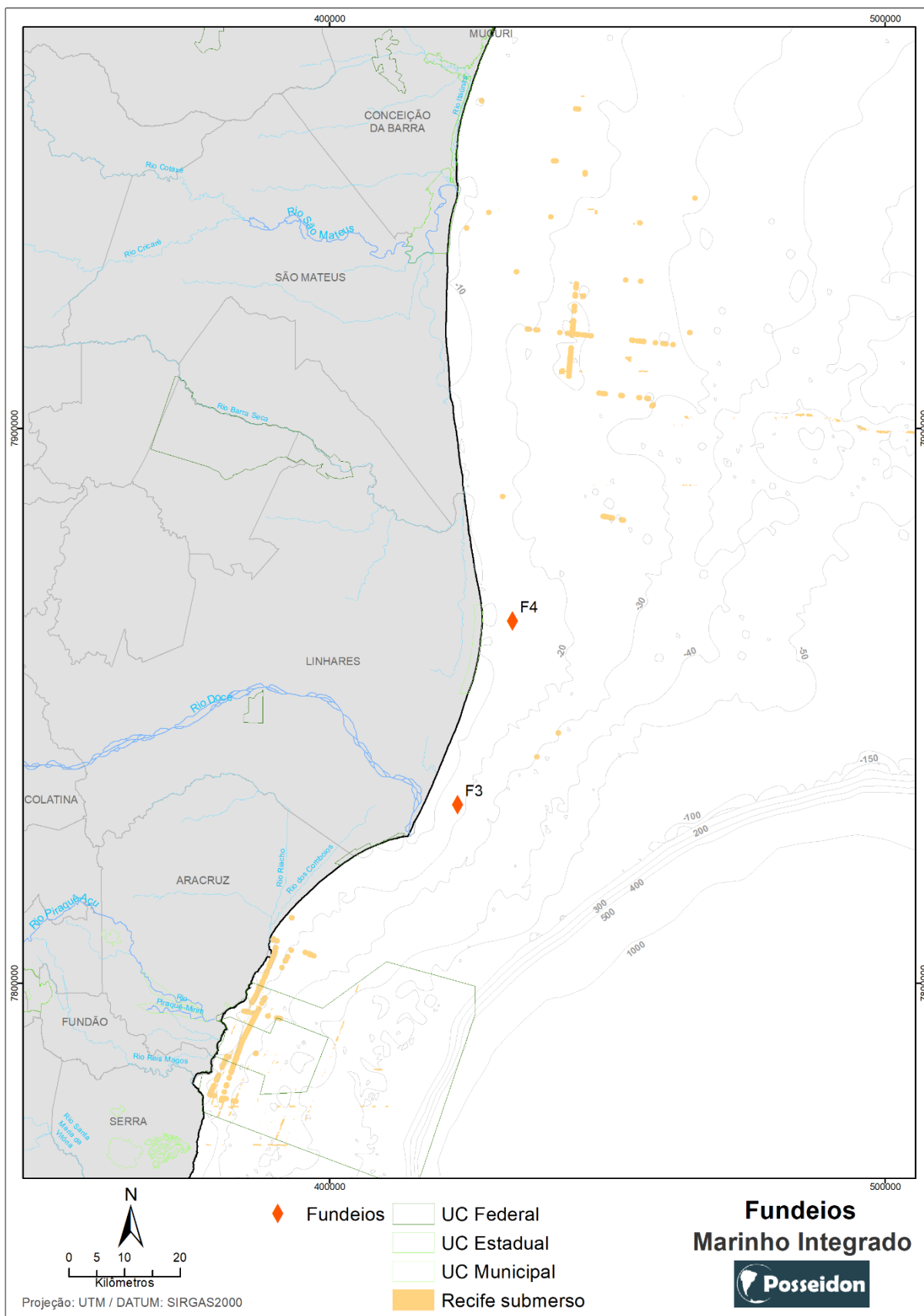


Figura 2: Localização dos pontos de fundeio propostos para o presente monitoramento.



6.2. Meta 1 - Perfilagem de CTD

- **Coleta Trimestral**

Em cada estação amostral serão obtidos perfis verticais de temperatura, salinidade (estimada a partir da condutividade), turbidez, fluorescência e oxigênio dissolvido com o auxílio de um equipamento CTD com sensores acoplados com frequência de amostragem trimestral.

- **Processamento**

Os dados obtidos serão tratados com o auxílio do software *Matlab* ou com o software disponibilizado pelo próprio fabricante do equipamento. Esse procedimento assegura que os dados não apresentarão valores discrepantes e/ou descontinuidades nas análises posteriores. As etapas deste procedimento incluem:

- **Filtragem:** Utilização de um filtro passa-baixa para eliminar as altas frequências (ruídos) dos dados de temperatura, condutividade e pressão. Assim, serão detectados e retirados valores discrepantes (*spikes*) utilizando o critério de separar verticalmente os perfis em 5 m e, em cada bloco, eliminando os valores que forem superiores (inferiores) a ele mesmo somado (subtraído) de três vezes o desvio padrão do bloco.
- **Binagem:** Médias verticais dos dados a cada 1 dbar de coluna de água de forma que os perfis fiquem equi-espaçados verticalmente.
- **Alisamento por janela móvel:** Substituição dos valores por uma média ponderada entre eles mesmos e os valores adjacentes. O tamanho da janela será ajustado às baixas profundidades da área de estudo. A janela aplicada será do tipo *Hanning* cuja distribuição de peso é de caráter gaussiano, ou seja, o maior peso é atribuído ao valor central.

Por fim, serão estimadas outras propriedades oceanográficas a partir da temperatura, condutividade e pressão com o auxílio do pacote de rotinas *GSW Oceanographic Toolbox* desenvolvido por McDougall e Barker (2011).

- **Análise**

Os dados serão analisados por meio de seções horizontais e verticais e de mapas, de modo que auxiliem na compreensão de como a dinâmica oceanográfica local condiciona o padrão de distribuição e destino final do material de rejeito no ambiente marinho.

6.3. Meta 2 - Fundeio

- **Obtenção dos dados**

Um total de duas linhas de fundeio já instaladas na região do entorno/norte da foz do Rio Doce serão utilizadas para obter medidas de ondas, correntes, dados termohalinos e físico-químicos (fluorescência e turbidez). Cada linha de fundeio contempla uma medição junto ao fundo e outra próxima a superfície

dos parâmetros termohalinos e físico-químicos. As medições de ondas e correntes são realizadas por um equipamento perfilador acústico (ADCP) colocado próximo ao fundo. Os dados serão extraídos mensalmente dos equipamentos através da realização de embarques de coleta e manutenção.

- **Processamento**

As séries temporais medidas serão analisadas tanto no domínio da frequência quanto no domínio do tempo.

Os dados de corrente serão rotacionados conforme a inclinação da linha de costa (ou linhas batimétricas locais) de forma a se trabalhar com as componentes *alongshore* e *cross-shore* da circulação local. Para cada ponto serão produzidos perfis médios (e respectivos desvios-padrão) de velocidade, avaliando-se no domínio da frequência os principais períodos de processos oceanográficos que ocorrem na região (circulação da maré, vazão do rio, circulação induzida pelo vento, ressurgência costeira). Serão relacionados os diferentes parâmetros (temperatura, salinidade, correntes, fluorimetria), tanto no domínio do tempo quanto em análises espectrais cruzadas. Essas análises serão focadas (mas não limitadas) ao entendimento das diferenças entre a circulação da superfície e do fundo na região e na inter-comparação entre os dados obtidos para cada um dos pontos de fundeio.

Associadas às medições de correntes, serão realizadas medições de ondas de gravidade superficiais através da obtenção dos principais parâmetros de onda: altura significativa, período e direção de pico.

A partir da caracterização dos principais processos físicos que atuam na plataforma interna da região, as séries serão filtradas conforme os períodos obtidos utilizando um filtro digital recursivo, para separar as diferentes bandas do espectro local de processos que atuam no sedimento e demais parâmetros biogeoquímicos. A divisão da dinâmica local em diferentes escalas temporais de processos oceanográficos permitirá melhor caracterizar os processos físicos que atuam na foz do Rio Doce e adjacências e avaliar a capacidade dos resultados numéricos de reproduzir os principais processos locais e regionais.

6.4. Meta 3 - Sensoriamento Remoto

Os dados de concentração de clorofila-a ([chlor-a]) e de turbidez superficial são derivados das medições da cor do oceano realizadas via sensoriamento remoto. Já a quantificação da temperatura da superfície do mar (TSM) resulta da radiação emitida nos primeiros milímetros da coluna d'água (SOUZA, 2005).

Os dados de [chlor-a] são provenientes de uma análise mista das reflectâncias na banda do espectro correspondente ao vermelho, azul e verde e a profundidade da coluna d'água onde é inferido esse dado pode variar de pouco menos de um metro em oceanos costeiros com alta turbidez a até mais de 30 metros em oceanos profundos de baixa turbidez (GORDON & McCLUNEY, 1975; SOUZA, 2005).

O cálculo da turbidez superficial da água será derivado a partir de técnicas de processamento de dados de reflexão da luz nos comprimentos de onda de 645 nm (banda da cor vermelha do espectro visível) e 859 nm (reflectância no comprimento de onda no infravermelho próximo) em ambientes marinhos de

alta e baixa turbidez a uma distância mínima de 750 metros da costa com resolução espacial de 250 m (Dogliotti *et al.*, 2015; Aurin *et al.*, 2013). Esse resultado tende a fornecer uma análise satisfatória da dispersão de sedimentos terrígenos na superfície do oceano, mas têm uma importante limitação sobre a profundidade máxima da informação obtida, já que a luz vermelha proveniente do sol é praticamente toda absorvida nos primeiros dois metros de coluna d'água (GORDON & McCLUNEY, 1975). A presença de sólidos ou dissolvidos na água altera essa penetração em alguns centímetros. Já o infravermelho próximo é nove vezes mais absorvido pela água, limitando a sua penetração a poucos centímetros (GORDON & McCLUNEY, 1975, SOUZA, 2005).

A presença de nuvens sobre o oceano durante a obtenção dos dados pelo satélite é o principal limitante comum a todas as medidas realizadas com radiação refletida ou emitida impedindo, dessa forma, as suas quantificações.

Para essas análises serão selecionados dados diários obtidos pelo sensor Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) (NASA, 2018), um a bordo do satélite Aqua (NASA, 2018) e outro a bordo do satélite Terra (NASA, 2018). Esses processamentos consistirão na conversão de arquivos nível 1A de processamento em nível 2 e posteriormente em nível 3, (L1A > L1B > L2 > L3b > L3m) utilizando o software SeaDAS, disponibilizado pelo portal Oceancolor da NASA.

6.5. Meta 4 - Modelagem numérica hidrodinâmica

O modelo ROMS está sendo utilizado para evidenciar processos costeiros de submesoescala e mesoescala ao longo da plataforma continental do Espírito Santo e oceano adjacente.

Dois domínios numéricos com distintas resoluções espaciais estão sendo utilizados para as simulações hidrodinâmicas de caráter realístico e não realísticas. No domínio de maior área (grade 1), com resolução espacial implementada igual a $1/24^\circ$ (aproximadamente 4,6 km), cobrindo a região entre 49° e 27° W e entre 8° e 27° S. Aninhada a grade 1, foi utilizada a técnica de *downscaling two-way* numa segunda grade (grade 2), que apresenta resolução espacial de $1/120^\circ$ (0,9 km). A grade 2 abrange a plataforma continental do ES entre o Banco de Abrolhos e o sul do Estado do Espírito Santo (41° e $36,4^\circ$ W e $16,7^\circ$ e $21,5^\circ$ S).

A elevação da superfície foi parametrizada pela condição limite de Chapman (modo explícito) (CHAPMAN, 1985), enquanto que as parametrizações radiation/nudging e Flather (2D momentum) (FLATHER, 1976) foram utilizadas para as componentes baroclínica e barotrópica, respectivamente. O modo *radiation* utilizado foi resolvido por Orlanski (1976) e Raymond e Kuo (1984) e reproduziu do fluxo de entrada e saída ao longo do contorno, bem como em diferentes profundidades da mesma localização horizontal. Um relaxamento para os traçadores climatológicos de temperatura e salinidade (T-S) foi aplicado em 5 dias no interior do domínio. A difusão horizontal harmônica ($10 \text{ m}^2/\text{s}$) foi utilizada para momentum e os traçadores (temperatura e salinidade). Os traçadores foram misturados ao longo das superfícies geopotenciais e o momentum foi misturado ao longo dos níveis sigma. Uma camada de esponja para difusividade de 30 pontos de grade foi incluída nos limites abertos da Grade 1 e 2,

enquanto o coeficiente de viscosidade horizontal foi mantido constante em todo o domínio ($Ah = 50 \text{ m}^2/\text{s}$). A mistura turbulenta vertical foi o Generic Length Scale (GLS: $k-k_l$) para os parâmetros de fechamento turbulento (WARNER et al., 2005). A tensão de cisalhamento de fundo foi parametrizada segundo a lei quadrática de arrasto do fundo, com coeficiente de arrasto igual a $C_d = 3 \times 10^{-3}$.

A discretização vertical adotada é de 40 camadas sigma com os parâmetros de estiramento de superfície e fundo prescritos como 6,5 e 2,5, respectivamente. A batimetria foi obtida a partir da Carta Batimétrica Geral dos Oceanos (GEBCO) com resolução espacial de 30 segundos de arco (COI et al., 2003). As condições de forçamento de superfície incluem vento, umidade, pressão, temperatura do ar, precipitação e dados de radiação obtidos do ERA 5 - *Copernicus Climate Change Service* (C3S), quinta geração de reanálises atmosféricas de ECMWF do clima global (CDS) (Hersbach et al., 2020), com resolução temporal de 1 hora e 31 km de resolução espacial. A forçante de maré foi obtida do banco de dados global TPXO 9.0 (Egbert e Erofeeva, 2002), que forneceu amplitudes e fases dos dez principais constituintes harmônicos de maré com resolução espacial de $1/4^\circ$ $1/4^\circ$, utilizados nos limites abertos da grade grossa (M_2 , S_2 , N_2 , K_2 , K_2 , O_1 , P_1 , Q_1 , M_f e M_m). O Hybrid Coordinate Ocean Model (HYCOM Global $1/12^\circ$, aproximadamente 9,5 km de resolução horizontal) juntamente com a reanálise do sistema de Assimilação de Dados Oceânicos Acoplados à Marinha (NCODA) (HYCOM, 2011) forneceu as condições iniciais e diárias dos limites (temperatura, salinidade, elevação e velocidades).

6.6. Meta 5 - Modelagem numérica de transporte de sedimentos

- **Análise dos dados**

Os dados já coletados e processados serão analisados visando os objetivos da modelagem do transporte de sedimentos. Os resultados dessas análises serão apresentados e discutidos inicialmente e em conjunto com os resultados das simulações, principalmente no que se refere aos dados de turbidez e as forçantes responsáveis pelas mudanças.

Medições adicionais de turbidez poderão ser realizadas para melhor compreender o limiar de ondas quanto à ressuspensão. Também, será realizado em laboratório a calibração dos turbidímetros com amostra de sedimento do depósito (coletada em abril/2022). Também, serão analisados os resultados das coletas de água para determinação de concentração de sedimentos, realizadas nos fundeios durante sua manutenção.

Finalmente, serão realizadas 2 campanhas de densimetria junto com a equipe do Mapeamento, atividade que foi adiada por conta da pandemia. As campanhas serão realizadas em épocas representativas de mobilização de sedimentos (início do segundo semestre) e aporte de sedimentos pelo Rio Doce (início do ano).

- **Modelo Hidrodinâmico Costeiro**

Um modelo costeiro de detalhe será utilizado visando a obtenção das forçantes hidrodinâmicas relevantes para o transporte de sedimentos finos. As condições de contorno para essa modelagem

serão obtidas dos modelos regionais. O método de aninhamento utilizado será de uma via, onde as informações são repassadas do modelo de grade maior para o modelo mais refinado. Para reduzir o efeito de reflexão nas fronteiras são usadas condições de contorno fracamente reflexivas, usando as invariantes de Riemann. A base de dados será compatível com os modelos regionais já desenvolvidos, complementando com bases de dados de ondas e outras informações detalhadas que se façam necessárias.

A grade numérica compreende a região que vai da chamada Costa das Algas ao sul da foz do Rio Doce, até a região ao norte de Abrolhos. A janela temporal das simulações é de quatro anos, de 2019 até 2022, período em que foram realizadas medições. Serão apresentadas as comparações dos resultados das simulações com os modelos regionais e com os dados coletados. Essas comparações serão tanto em forma pontual, na forma de séries temporais, e regional, na forma de mapas. As séries temporais dos resultados da modelagem, serão obtidas para os locais relevantes, como nos pontos onde são realizadas as medições, locais de verificação da qualidade do aninhamento, assim como outros que sejam importantes na descrição dos processos apontados. Os mapas serão selecionados de forma a ilustrar eventos específicos ou períodos de tempo de interesse na obtenção de correntes residuais.

- **Modelo de Transporte de Sedimentos Finos**

Acoplado ao modelo costeiro de detalhe será utilizado um modelo de transporte de sedimentos finos, adequado para o tipo de material observado na Plataforma Continental Adjacente. Os parâmetros sedimentológicos necessários para essa modelagem serão obtidos do conjunto de medições que são realizadas desde o rompimento da barragem. As janelas espacial e temporal, assim como de apresentação de resultados, seguirão os critérios da modelagem hidrodinâmica. Cenários adicionais poderão contemplar hipóteses sobre o transporte de sedimentos, onde ocorram lacunas de informação e, portanto, requeiram análise de sensibilidade às hipóteses apresentadas.

- **Cálculo e modelagem do transporte de sedimentos finos por ondas**

Dando continuidade ao cálculo da deriva litorânea, realizado para o ano 2019, será utilizada a modelagem de ondas para cálculo da deriva, utilizando modelo paramétrico, para os anos 2020-2022, visando avaliar a distribuição do campo de correntes ao longo da costa.

Também serão realizadas simulações numéricas da deriva litorânea, utilizando uma grade costeira de detalhe com resolução da zona de surfe pelo menos na foz do Rio Doce e zona costeira de abrangência, para cenários específicos e com acoplamento de modelo de sedimentos. Estas simulações permitirão evidenciar a importância da deriva frente a outras correntes residuais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURIN, D. *et al.* Spatially resolving ocean color and sediment dispersion in river plumes, coastal

- systems, and continental shelf waters. **Remote Sensing of Environment**, v. 137, p. 212-225. 2013.
- CHAPMAN, D.C. Numerical treatment of cross-shelf open boundaries in a barotropic coastal ocean model. *J. Phys. Oceanogr.* 15, 1060–1075. 1985.
- DOGLIOTTI, A. I. *et al.* A single algorithm to retrieve turbidity from remotely-sensed data in all coastal and estuarine waters. **Remote Sensing of Environment**, v. 156, p. 157-168. 2015.
- EGBERT, G.D. & EROFEEVA, S.Y. Efficient inverse modeling of barotropic ocean tides. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, 19 (2), 183–204. 2002.
- FLATHER, R.A. A tidal model of the northwest European continental shelf. *Memories de la Societe Royale des Sciences de Liege*, 6 (10), pp. 141-164. 1976.
- GORDOM, H. R.; McCLUNEY, W., R. Estimation of the depth of the sunlight penetration in the sea for remote sensing. **Applied Optics**, v. 14, n. 2. 1975.
- HENDERSON-SELLERS, A., PITMAN, A. J., LOVE, P. K., IRANNEJAD, P., and CHEN, T. H. The Project for Intercomparison of Land Surface Parameterization Schemes (PILPS): Phases 2 and 3*, B. *Am. Meteorol. Soc.*, 76, 489–504. 2020.
- McDOUGALL, T. J.; BARKER, P. M. Getting started with TEOS-10 and the Gibbs Seawater (GSW) Oceanographic Toolbox, 28 pp. SCOR/IAPSO WG127, ISBN 978-0-646-55621-5.
- NASA Goddard Space Flight Center, Ocean Ecology Laboratory, Ocean Biology Processing Group. Moderate-resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) Aqua Ocean Color Data; 2018 Reprocessing. NASA OB.DAAC, Greenbelt, MD, USA. doi: data/10.5067/AQUA/MODIS/L2/OC/2018. 2018.
- ORLANSKI, I. A simple boundary condition for unbounded hyperbolic flows. *J. Comp. Sci.* 21(3), 251–269. 1976.
- RAYMOND, W.H., KUO, H.L. A radiation boundary condition for multi-dimensional flows. *Quart. J. R.Met. Soc.* 110, 535–551. 1984.
- RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual – Anexo 3 Marinho – Modelagem Numérica. RT-19D, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 246 pag. 2019.
- RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Ambiente Marinho. RT-36D, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1600 pag. 2020.
- SOUZA, R. B. Oceanografia por satélites. Oficina de Textos, 2005.
- WARNER, J.C. *et al.* Performance of four turbulence closure methods implemented using a generic length scale method. *Ocean Model.* 8, 81–113. 2005.

SEDIMENTAÇÃO COSTEIRA

1. EQUIPE TÉCNICA

Bolsa (Modalidade)	Função	Nome
IC	apoio as atividades de campo / Calibração de equipamentos de campo	Pedro Adalberto Ramos Bizelli
IC	separação e catalogação de material carbonático, matéria orgânica e macrofósseis em armadilhas de sedimentos	Leticia Eller
IC	separação e catalogação de material carbonático, matéria orgânica e macrofósseis em armadilhas de sedimentos	Pedro Henrique Gomes da Silva dos Santos
IC	apoio ao processamento de amostras para mineralogia e composição elementar	A ser definido
IC	apoio ao processamento de amostras para espectrometria de massa para Sr e Nd	João Ricardo Coutinho de Barcellos
Pós-Doutorado	Gerenciamento de toda a logística de campo, confecção e manutenção das armadilhas de sedimentos, sensores de temperatura e salinidade	Eduardo Delfino Sodre
Pós-Doutorado	Uso de modelos meteorológicos e oceanográficos para comparação com dados sedimentológicos	Luciana Figueiredo Prado
Pós-Doutorado	Pré-processamento de amostras de sedimentos, cálculo do fluxo de material litogênico, carbonático e matéria orgânica	Elaine Alves dos Santos
Coordenação temática	Coordenação Geral de Todas as atividades do Projeto: processos sedimentares, sensoriamento remoto, mineralogia e análises elementares	Heitor Evangelista da Silva
Membro de Equipe	Controle de qualidade dos processos químicos em geral	Bruno Vinicius Ximenes de Oliveira
Membro de Equipe	Gerenciamento das atividades de sedimentologia na APA Costa das Algas	Marcus Vinicius Licínio
Doutor/ Profissional Pleno	Controle de qualidade das análises isotópicas e determinação de curvas de mistura sedimentar. Análise geológica e isotópica. Definição dos modelos de mistura	Claudio de Morisson Valeriano
Mestre / Técnico Sênior	Pre-processamento das amostras provenientes da APA Costa das Algas e apoio a logística da APA Costa das Algas e sensoriamento remoto	Newton de Magalhães Neto
Graduado	Preparo de sais e reagente e destilação ácida	Yasmin Fernandes Rocha
Graduado	Apoio ao processamento de imagens de satélite	A ser definido

2. ESCOPO

As atividades relativas a esta proposta de Sedimentação Costeira visam o monitoramento oceânico do fluxo sedimentar e natureza dos sedimentos para duas regiões, entre aquelas ecologicamente relevantes localizadas nas adjacências da Foz do Rio Doce: (1) ao Norte, na porção capixaba do Banco de Abrolhos, onde encontramos os recifes esquecidos; e (2) ao Sul, na APA Costa das Algas. Este monitoramento é proposto para acontecer em duas partes: (1) monitorar, em caráter sazonal, o material sedimentável nas regiões definidas acima, objetivando sua assinatura geoquímica, ao nível isotópico,

cujo emprego possibilita inferir a origem geológica dos sedimentos; (2) buscar uma relação entre o aporte sedimentar e as variáveis meteo-ocenográficas que atuam nas regiões de interesse através da aquisição de dados oceanográficos medidos *in situ*, modelos numéricos e uso de produtos de satélite. O estudo da sedimentação é empregado na caracterização de impactos decorrentes da atividade antrópica (ex.: a presença de traços de rejeitos de minério decorrentes do rompimento da barragem de Fundão) e do aporte decorrente da erosão de zona costeira decorrente do ciclo hidrológico, tempestades e a passagem de sistemas frontais que atingem a região. Além da análise isotópica dos sedimentos, o estudo prevê a análises mineralógicas e de composição elementar sobre os sedimentos no sentido de oferecer maior robustez as interpretações relativas à proveniência mineral.

3. OBJETIVO

Determinar a proveniência dos sedimentos em suspensão na coluna d'água nas duas regiões monitoradas ao Norte e ao Sul da foz do Rio Doce, tendo em vista as diferentes fontes terrígenas que influenciam a região. Neste contexto, avaliar a contribuição relativa dos sedimentos que fluem através da foz do Rio Doce.

No contexto da Sedimentação Costeira, objetiva-se:

- (1) empregar técnicas de geologia isotópica visando a proveniência geológica dos sedimentos coletados nas armadilhas. Para tal empregaremos a assinatura geoquímica, baseada em isótopos radiogênicos de Sr e Nd como também implementar um algoritmo de mistura isotópica;
- (2) empregar a mineralogia e a análise de composição elementar no sentido de dar maior robustez às análises isotópicas;
- (3) caracterizar as fontes sedimentares nas regiões de interesse deste estudo anteriores ao rompimento da barragem de Fundão.
- (4) caracterizar as condições meteo-oceanográficas correspondentes aos períodos de integração das amostras, visando comparar os processos sedimentológicos as condições de pluviosidade continental, vazão de rios, frequência de frentes frias e padrões de correntes marinhas.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Consolidar o uso da assinatura de origem dos sedimentos a partir de isótopos radiogênicos como ferramenta para detecção da presença de traços de rejeitos proveniente da barragem de Fundão nas áreas oceânicas dos recifes esquecidos na porção capixaba do Banco dos Abrolhos e APA Costa das Algas

A estratégia adotada por este grupo de trabalho objetiva estabelecer uma assinatura geoquímica ao nível isotópico da origem mineral para os sedimentos que aportam nas regiões de interesse aqui

definidas. De forma complementar a esta abordagem técnica, realizamos a análise de todos os potenciais termos-fonte sedimentares que atuam na região, ou seja, os sedimentos que fluem pela foz do Rio Doce, sedimentos dos principais rios que desembocam diretamente na região e sedimentos das zonas costeiras expostos a erosão pluviométrica. Neste contexto, um modelo de mistura isotópica é aplicado no sentido de inferir sobre os percentuais de contribuição de cada fonte sedimentar postulada. Os minerais e as rochas tem razões distintas de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, de acordo com a derivação geológica. Estas razões isotópicas estão menos sujeitas a interferências ambientais quando comparadas aos elementos químicos de um modo geral. No estudo hidrológico as diferenças na composição isotópica do Sr e Nd no material particulado em suspensão carregados pelos rios que alimentam os oceanos, revelam uma sobreposição de assinaturas, refletindo a heterogeneidade das rochas fontes na escala de cada bacia de drenagem (GOLDSTEIN & JACOBSEN, 1988; WALTER et al., 2000). Para se identificar a proveniência continental de sedimentos a combinação das assinaturas dos isótopos radiogênicos $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ é uma das mais qualificadas, devido, entre outros fatores, suas razões típicas em determinados domínios geológicos (LEE et al., 2010). Essas razões estão pouco sujeitas ao fracionamento isotópico decorrente do intemperismo quando aplicado aos estudos de curta escala de tempo (GAIERO et al., 2004). Além disso, a composição dos isótopos radiogênicos de Sr e Nd da litosfera são significativamente diferentes do manto, o que permite a distinção entre as suas origens litológicas das zonas vulcânicas jovens e dos velhos escudos continentais, (GROUSET & BISCAYE, 2005).

META 2 - Caracterizar as condições meteoceanográficas para os intervalos de integração das amostragens visando comparações com os dados sedimentológicos

Para cada período de coleta sedimentar, empregaremos análises de dados meteorológicos coletados regionalmente e modelos para a dinâmica atmosférica e oceânica no sentido de interpretar os dados sedimentológicos à luz das alterações no ambiente marinho e componente atmosférica.

5. PRODUTOS

Obs: em negrito o responsável principal

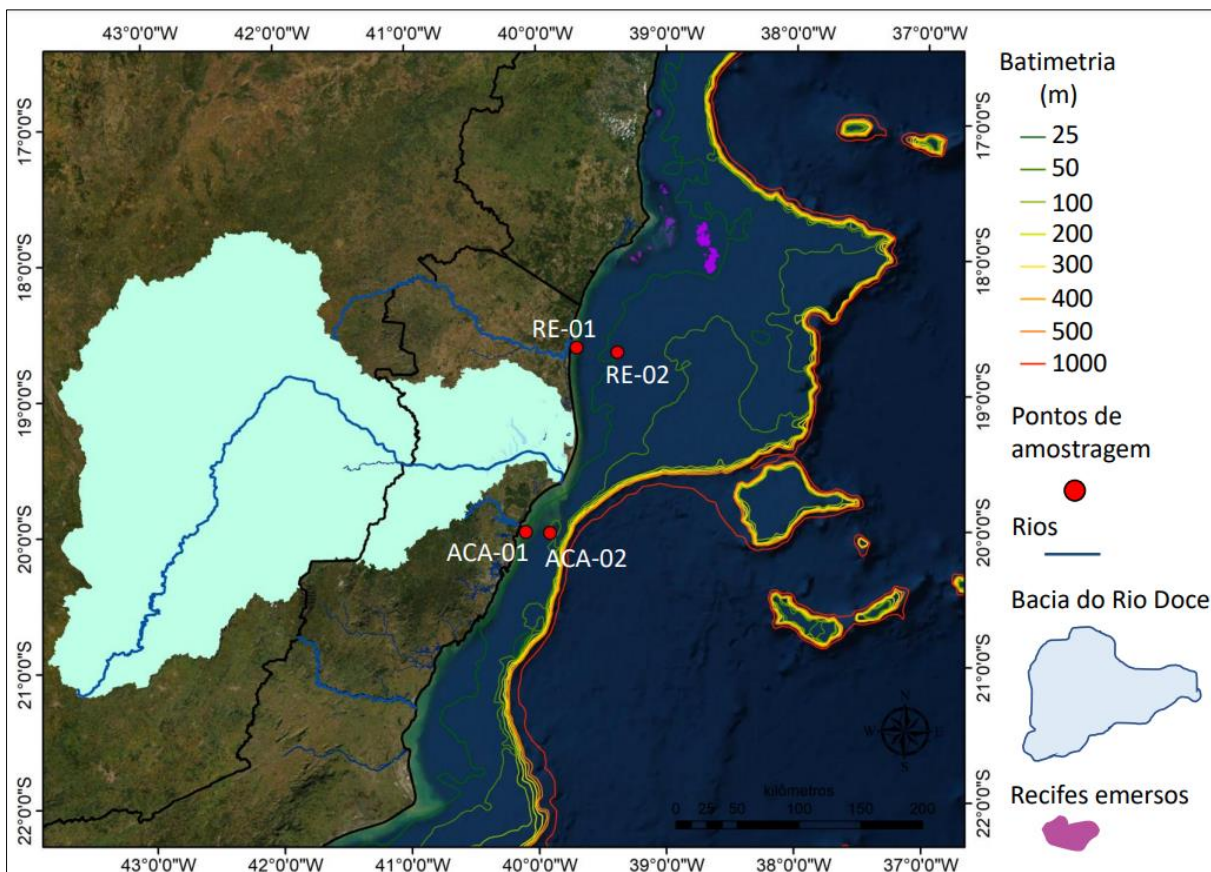
5.1 DADOS BRUTOS	Responsáveis
Dados de razões isotópicas para Sr e Nd, em sedimentos armadilhados	Claudio de Morisson Valeriano Heitor Evangelista da Silva
Dados de razões isotópicas para Sr e Nd, em sedimentos de rios regionais e em testemunhos de sedimentos datados	Claudio de Morisson Valeriano Heitor Evangelista da Silva
Fluxos sedimentares	Eduardo Delfino Sodre Bruno Vinicius Ximenes de Oliveira
Dados de composição elementar em sedimentos armadilhados	Elaine Alves dos Santos Marcus Vinicius Licínio
Dados da mineralogia dos sedimentos armadilhados	Elaine Alves dos Santos Marcus Vinicius Licínio
Dados de parâmetros das águas oceânicas superficiais durante os períodos de coleta em campo: turbidez, MPS, salinidade e temperatura	Newton de Magalhães Neto
Caracterização meteo-oceanográfica durante os períodos de coleta	Luciana Figueiredo Prado

5.2 ANÁLISE DE DADOS	Responsáveis
Análise de razões isotópicas para Sr e Nd em sedimentos armadilhados	Claudio de Morisson Valeriano Heitor Evangelista da Silva João Ricardo Coutinho de Barcellos
Análise de razões isotópicas para Sr e Nd em sedimentos de rios regionais e em testemunhos de sedimentos datados	Claudio de Morisson Valeriano Heitor Evangelista da Silva João Ricardo Coutinho de Barcellos
Fluxos sedimentares	Eduardo Delfino Sodre Bruno Vinicius Ximenes de Oliveira Letícia Eller Pedro Henrique Gomes da Silva dos Santos
Análise de composição elementar em sedimentos armadilhados	Elaine Alves dos Santos Marcus Vinicius Licínio Bruno Vinicius Ximenes de Oliveira
Análise da mineralogia dos sedimentos armadilhados	Elaine Alves dos Santos Marcus Vinicius Licínio Bruno Vinicius Ximenes de Oliveira
Dados de parâmetros das águas oceânicas superficiais durante os períodos de coleta em campo: turbidez, MPS, salinidade e temperatura	Newton de Magalhães Neto Pedro Adalberto Ramos Bizelli
Caracterização meteo-oceanográfica durante os períodos de coleta	Luciana Figueiredo Prado Newton de Magalhães Neto

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência amostral

Figura 3: Malha amostral de Sedimentação Costeira.



As amostragens serão trimestrais visando o alinhamento com todas demais atividades do ambiente marinho; sendo duas estações amostrais para cada área de estudo (Recifes Esquecidos, Norte da foz do Rio Doce; e APA Costa das Algas, Sul da foz do Rio Doce). Em cada estação amostral, serão instalados 2 coletores de sedimentos. Um a aproximadamente 5 km da linha de costa e um segundo em torno de 25 km da linha de costa. As coordenadas geográficas programadas para as Estações são as seguintes:

Apa Costa das Algas: ACA-01 (20°00'26''S; 40°05'39''W – profundidade: 14 m) e ACA-02 (20°01'00''S; 39°54'17''W – profundidade: 57 m) e Recife Esquecidos: RE-01 (18°38'57''S; 39°41'40''W – profundidade: 20 m) e RE-02 (18°40'59''S; 39°22'44''W – profundidade: 20 m), vide Figura 3. Em relação aos 2 sistemas passivos de amostragem, utilizaremos uma armadilha fixa, de troca manual da garrafa amostradora de sedimentos, para a estação *in shore*, e para a segunda estação de coleta, *off shore*, um sistema automático tipo coletor “MacLane”. Este amostrador será programado para troca de garrafas em frequência mensal e será fixado na coluna d’água.

6.2. META 1 - Consolidar o uso da assinatura de origem dos sedimentos a partir de isótopos radiogênicos

As atividades de campo se constituem na instalação e manutenção das armadilhas que integram a coleta de material sedimentável e do monitoramento de parâmetros da coluna d’água durante as missões de campo programadas. Deve-se ressaltar que o monitoramento sedimentológico ocorre de forma contínua, uma vez que as armadilhas permanecem ininterruptamente expostas nas áreas de interesse sedimentológico. Basicamente, o sistema funciona com o aprisionamento do sedimento que se deposita livremente da coluna d’água no sentido do substrato marinho. O conteúdo sedimentar adentra um cone de captura através de uma grade instalada na “boca” do coletor. O material é diretamente introduzido numa garrafa amostradora de borossilicato de 1 L, que é trocada a cada campanha. Possui internamente uma garrafa graduada de borossilicato de 1 L para aprisionamento do material sedimentado e que pode ser trocada a cada campanha. A manutenção dos integradores de sedimentos é de fácil manuseio podendo todo o conjunto ser retirado, se necessário, sem a remoção de seus fixadores. Sua tampa superior removível facilita sua manutenção como a remoção de cracas ou de algas alojadas no compartimento superior da armadilha. Além das armadilhas fixas com garrafa individual, está prevista a instalação de uma roseta de coletores programada para troca subaquática automática. Trata-se do amostrador *McLane* para 13 garrafas. Considerando-se os padrões típicos de sedimentação para a região, este sistema será programado para realizar coletas automáticas a cada 30 dias de forma a não gerar “overflow” sobre as garrafas amostradoras. Uma sonda multiparamétrica será empregada para a monitoração dos parâmetros oceanográficos. No setor continental, sedimentos das fozes dos principais rios regionais também serão amostrados a cada semestre visando determinar suas assinaturas isotópicas para Sr e Nd. Estes dados serão empregados no modelo de mistura isotópica entre as assinaturas dos sedimentos na foz do Rio Doce e fontes locais de sedimentos.

O sistema isotópico do Sm-Nd é baseado no decaimento do isótopo radioativo ^{147}Sm para o isótopo

radiogênico ^{143}Nd a uma taxa de $6,54 \times 10^{-12}$ por ano (Lugmair & Marti, 1977) e com uma meia vida de 106 bilhões de anos (Dickin, 2005). Todas as medidas isotópicas em laboratório são feitas por meio de razões em relação a um isótopo natural, não radiogênico, nesse caso ^{144}Nd . Essa normalização evidencia a proporção radiogênica do Neodímio, refletindo a origem da rocha (manto versus crosta terrestre) e, por consequência, dos sedimentos dela derivados. No caso da razão isotópica $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ os valores medidos possuem variações significativas muito pequenas entre as amostras. Portanto, é convencional apresentar os dados utilizando uma notação (ϵNd) que indica a diferenciação da amostra de um modelo de reservatório do manto comum a todo planeta Terra, chamado CHUR (meteoritos condriticos; De Paolo & Wasserburg, 1976). A equação para tanto é apresentada a seguir:

$$\epsilon\text{Nd} = \left(\frac{^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}_{\text{amostra}}}{^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}_{\text{CHUR}}} - 1 \right) \times 10^4 \quad \text{Eq. 1}$$

Por sua vez, o sistema isotópico do Rb e Sr é baseado no decaimento do isótopo radioativo ^{87}Rb para o isótopo radiogênico ^{87}Sr a uma taxa de $1,42 \times 10^{-11}$ por ano (Aldrich et al., 1953). As razões isotópicas são normalizadas pelo isótopo natural ^{86}Sr .

O fracionamento entre os isótopos destes sistemas ocorre primordialmente durante a diferenciação da crosta a partir do manto. As rochas cálcicas e ferro-magnesianas do manto tendem a concentrar o Sm e o Sr durante a diferenciação (fusão parcial), enquanto o Nd e o Rb se concentram nas rochas mais silicosas e potássicas da crosta, formadas a partir da fusão parcial das rochas do manto. Portanto, a crosta sempre terá uma razão $\text{Sr}_{\text{radiogênico}}/\text{Sr}_{\text{natural}}$ maior, e uma razão $\text{Nd}_{\text{radiogênico}}/\text{Nd}_{\text{natural}}$ menor em relação ao manto de origem (De Paolo & Wasserburg, 1976).

Ainda que os sistemas Sm-Nd e Rb-Sr mostrem uma correlação negativa entre os valores em rochas ígneas da crosta oceânica e da crosta continental, esta mesma correlação não é observada em sedimentos e rochas sedimentares metamorfasadas. Isso acontece por causa do intemperismo e alteração química dos minerais. Durante o intemperismo, os elementos terras-raras e o rubídio tendem a ser adsorvidos e ocupam espaços nas estruturas dos argilo-minerais. O estrôncio, por sua vez, tende a ser lixiviado dos minerais e se concentra na água. Em sedimentos antigos, observamos um aumento da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ em relação às rochas de origem, em virtude do contínuo decaimento radioativo do ^{87}Rb contido no sedimento. No entanto, em sedimentos atuais, não há tempo para que a razão isotópica seja significativamente alterada por conta do decaimento do ^{87}Rb . Portanto, nesses casos, a razão isotópica deve corresponder àquela da sua origem, mesmo que esta tenha um histórico de intemperismo anterior.

A partir do diagrama ϵNd versus $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, podemos observar diferenciações entre campos dentro da própria crosta continental. Como exemplo, os granitoides de idade Ediacarana (635 a 541 Ma) e Cambriana (541 a 485 Ma) possuem ϵNd menos negativo e valores de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ menores do que as rochas de idade Paleoproterozoicas e Arqueanas (> 1600 Ma). Nesse sentido, estes reservatórios crustais caracterizam grupos geoquímicos dos quais os sedimentos podem ser diretamente derivados. Assim, as razões isotópicas de rochas sedimentares se diferenciam das razões elementares (e as complementam) por indicar as origens e contextos geotectônicos das rochas fontes.

Quando os sedimentos possuem valores isotópicos intermediários entre dois grupos isotópicos, são

feitos testes de hipótese para indicar mistura entre os grupos. A equação utilizada para esta análise é apresentada abaixo (Faure, 1978):

$$R_M^x = \frac{R_A^x X_{Af} + R_B^x X_{Bf}}{X_{Af} + X_{B(1-f)}} \quad \text{Eq. 2}$$

Na equação, R é a razão isotópica do elemento x, com concentração X, dos componentes (*end-members*) A e B. O valor f nessa equação representa a proporção do componente A em relação a B, para a mistura M.

Igualando as equações de mistura para as duas razões isotópicas de interesse, isto é, $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, temos a equação proposta por Allègre (1969)

$$\frac{R_1 - R_M}{R_M - R_2} = K \frac{\rho_1 - \rho_M}{\rho_M - \rho_2} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde R é a razão isotópica $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ e ρ a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$; 1 e 2, componentes da mistura isotópica (*end members*); M, amostra em análise (mistura entre fontes); K, razão entre a razão elementar Sr/Nd das componentes. A curva hiperbólica resultante, portanto, pressupõe misturas entre somente dois componentes. Ela é usada como um modelo para detectar misturas possíveis e também quantificá-las. No entanto, temos que lembrar que o método se baseia na tendência de comportamento pareado entre os dois sistemas isotópicos e em sua preservação a partir do momento da erosão de sua área fonte.

Em suma, as assinaturas geoquímicas dos sedimentos armadilhados baseiam-se nas razões dos isótopos de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ e de forma complementar a caracterização mineralógica e de composição elementar. As razões isotópicas $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ versus $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ quando descritas num plano cartesiano são usadas como referência para estudos de proveniência sedimentar e para estudos de misturas isotópicas de dois componentes isotopicamente contrastantes. Estas técnicas, combinadamente, constituem-se em uma robusta metodologia para se demonstrar a existência (ou inexistência) de vestígios da pluma de sedimentos do Rio Doce sobre as áreas de interesse desta proposta. Sobre os sedimentos armadilhados, realiza-se um complexo processo de dessalinização, seguido de remoção da matéria orgânica, sílica biogênica e carbonados para finalmente analisar o resíduo litogênico remanescente e nesta fração avaliar o conteúdo isotópico.

- Caracterizar as amostras quanto à composição elementar e mineralógica

Estas atividades serão complementares as análises isotópicas visando uma mais ampla caracterização das amostras sedimentares. Tais resultados permitirão avaliar o enriquecimento de Fe nas amostras e suas mineralogias de origem. As determinações serão baseadas nas técnicas de FRX e DRX;

- Condições pré-existentes

As condições de pré-existência, referentes as características dos sedimentos antes do rompimento da barragem de Fundão, serão determinadas a partir de camadas sedimentares anteriores ao evento. Para tal, coletaremos um testemunho sedimentar de cada região, sendo suas camadas sedimentares datadas por Pb-210, cuja escala de tempo da técnica geocronológica permite inferir acumulações de

sedimentos em uma escala temporal de aproximadamente 150 anos, com resolução semi-decadal. Para tal será empregada a espectrometria gama de alta resolução fazendo uso de um detector de germânio hiperpuro coaxial (HPGe) de faixa de energia estendida (modelo GX5021 – Canberra) com eficiência relativa de 50% e resolução de 2,1 keV (FWHM) no ^{60}Co (1,33 MeV) pico de energia. Este sistema é instalado em uma blindagem de Pb de muito baixo ruído de fundo com espessura média de 15 cm, revestida internamente com Cu puro. O modelo geocronológico utilizado neste trabalho será o Constant Rate of Supply (CRS). A cronologia é baseada na fração não suportada do Pb-210 total:

$$^{210}\text{Pb}_{\text{unsupported}} = ^{210}\text{Pb}_{\text{total}} - ^{210}\text{Pb}_{\text{supported}} \text{ onde } ^{210}\text{Pb}_{\text{supported}} = ^{226}\text{Ra}$$

Neste modelo, as taxas de acúmulo de sedimento em massa são uma medida de sedimentação que muda com a profundidade. As taxas de sedimentação são determinadas traçando o logaritmo do excesso de atividades de Pb-210 em relação aos pesos acumulados de sedimentos secos e calculando as taxas de sedimentação em intervalos de inclinação constante. De acordo com Appleby e Oldfield (1983), a idade das camadas sedimentares pode ser obtida pela equação:

$$t = \frac{1}{\lambda} \ln \left(\frac{A_o}{A_x} \right)$$

onde A_o é a atividade total de Pb-210 não suportado na coluna de sedimentos e A_x é a atividade total de Pb-210 não suportado na coluna de sedimentos abaixo da profundidade x e λ a constante de decaimento radioativo do Pb-210 (0,03114).

6.3. META 2- Caracterização meteo-oceanográfica

Para a caracterização meteo-oceanográfica, serão utilizados dados provenientes da reanálise ERA5 do *European Centre for Medium-Range Weather Forecasts* (ECMWF). A reanálise ERA5 é baseada em assimilação de dados e consiste de média de conjunto (*ensemble*) de 10 membros. Possui resolução espacial de 0,25° para variáveis atmosféricas, e 0,5° para variáveis oceânicas. Foram utilizados dados diários e mensais referentes às variáveis vento zonal (m/s), vento meridional em superfície e em 925 hPa (m/s), temperatura do ar em 925hPa, pressão média ao nível do mar (PMNM, hPa), precipitação total (mm/dia) e temperatura de superfície do mar (°C). Estes dados podem ser encontrados de forma gratuita em <https://cds.climate.copernicus.eu/cdsapp#!/dataset/reanalysis-era5-single-levels-monthly-means?tab=overview>. Também será utilizado dados da reanálise oceânica *Global Ocean Data Assimilation* (GODAS) do *National Centers for Environmental Prediction* (NCEP). Os dados do GODAS possuem resolução espacial de 0,33° em latitude, e 1,0° em longitude. Foram utilizados dados mensais referentes às variáveis fluxo de momento zonal (N/m^2), fluxo de momento meridional (N/m^2), e salinidade de superfície do mar (psu). Este conjunto de dados pode ser encontrado gratuitamente em <https://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/GODAS/>. As análises serão realizadas utilizando os softwares R, Climate Data Operators (CDO) e Microsoft Excel.

No caso da identificação da ocorrência de frentes frias, será utilizado o método objetivo de rastreamento

de Pampuch e Ambrizzi (2015, 2016). Esta metodologia foi aplicada em dados diários de PMNM, temperatura do ar em 925 hPa e vento meridional em 925 hPa provenientes da reanálise ERA5, para o período de integração das amostras sedimentares. A frente fria é identificada se são registrados: aumento na PMNM, diminuição da temperatura do ar a 925 hPa, e mudança de quadrante norte para quadrante sul do vento meridional a 925 hPa, de forma simultânea. Esta metodologia foi aplicada ao ponto mais próximo da foz do Rio Doce que consta do estudo de Pampuch e Ambrizzi (2015, 2016), ou seja, em latitude 20°S e longitude 40°W. Posteriormente, a quantidade total de frentes frias será contabilizada para cada período amostral. Também será contabilizada a quantidade de dias com vento de quadrante sul, sem excluindo a ocorrência de frentes. Tanto a quantidade de frentes frias quanto de dias com vento de quadrante sul será comparada ao número total de dias por campanha, de forma a se obter a frequência relativa de ambos os eventos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C.M., Barbosa, C.F. Cordeiro, R.C., Seoane, J.C.S., Fermino, G.M., Silva, Turcq, B.J. 2013. Palaeoecology of a 3-kyr biosedimentary record of a coral reef-supporting carbonate shelf, Continental Shelf Research, 70:168-176,
- Amorim, F.N., Cirano, M., Soares, I.D., Campos, E.J.D., Middleton, J.F., 2012. The influence of large-scale circulation, transient and local processes on the seasonal circulation of the eastern Brazilian shelf, 13 °S. Cont. Shelf Res. 32, 47–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2011.10.011>.
- Amorim, F.N., Cirano, M., Marta-Almeida, M., Middleton, J.F., Campos, E.J.D., 2013. The seasonal circulation of the eastern Brazilian shelf between 10°S and 16°S: a modelling approach. Cont. Shelf Res. 65, 121–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2013.06.008>.
- Basile, D., I., Grousset F., Revel, M., Petit, Jr., Biscaye, P., Barkov, N., 1997. Patagonian Origin of Glacial Dust Deposited In East Antarctica (Vostok And Dome C) During Glacial Stages 2,4 And 6. Earth Planet. Sci. Lett. 146: 573-589,1997. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(96\)00255-5](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(96)00255-5).
- Bowen, H.J.M., Environmental chemistry of the elements, Academic Press, London, 1977
- Campos, C.P., Mendes J., Ludka I.P., by Medeiros S., Costa-de-Moura J., Wallfass C. 2004. A review of the Brasiliano magmatism in southern Espírito Santo, Brazil, with emphasis on post-collisional magmatism. In: Weinberg, R., Trouw, R., Fuck, R., Hackspacher, P. (Eds.), The 750-550 Ma Brasiliano event of South America. Journal of the Virtual Explorer, Eletronic Edition. ISSN 1441-8142, 17: Paper 1.
- Campos, C.P., Medeiros, S.R., Mendes, J.C., Pedrosa-Soares, A.C., Dussin, I., Ludka, I.P., Dantas, E., 2016. Cambro-Ordovician magmatism in the Araçuaí Belt (SE Brazil): snapshots from a post-collisional event. J. S. Am. Earth Sci. 68: 248-268. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2015.11.016>
- Castro, M.P. 2019. Evolução do Grupo Macaúbas e Formação Salinas no Orógeno Araçuaí Central,

MG. . 180 f. Tese (Doutorado em Evolução Crustal e Recursos Naturais) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

De Paolo, D.J., Wassenburg, G.J.1976. Nd Isotopic variations and petrogenetic models. *Geophys. Res. Lett.* 3 (5): 249-252. <https://doi.org/10.1029/GL003i005p00249>.

Dickin, A.P. 2005. *Radiogenic Isotope Geology*. Cambridge University Press, New York. <https://doi.org/10.1017/9781316163009>

Dussin, T. M. Associations Plutono-Volcaniques De L'espinhaço Méridional (Se-Brésil): Un Exemple D'évolution De La Croûte Protérozoïque. *Lab. Geologie Structurale, Univ. Orléans, Orléans, Tese De Doutorado*, 177 P, 1994.

Dussin, I.A., Dussin, T.M. 1995. Supergrupo espinhaço: modelo de evolução geodinâmica. *Geonomos*. 3, 19-26.: <https://doi.org/10.18285/geonomos.v3i1.212>

Evangelista, H., Godiva, D., Sifeddine, A., Leão, Z. M. A. N., Rigozo, N. R., Segal, B., Ambrizzi, T., Kampel, M., Kikuchi, R. K. P., Le Cornec, F. 2007. Evidences linking ENSO and coral growth in the Southwestern-South Atlantic. *Clim. Dyn.* 29: 869-880. <https://doi.org/10.1007/s00382-007-0271-8>.

Gonçalves, L., Alkmim, F., Pedrosa-Soares, A.C., Dussin, I.A., Valeriano, C.M., Lana, C., Tedeschi, M.F. 2015. Granites of the Intracontinental termination of a Magmatic Arc: An Example From The Ediacaran Araçuaí Orogen, Southeastern Brazil. *Gondwana Res.* <https://doi.org/10.1016/j.gr.2015.07.015>.

Hatje, V., Pedreira, R.M.A., Rezende, C.E., Schettini, C.E., Souza, G.C., Marin, D.C., Hackspacher, P.C. 2017. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Nat Sci Rep.* 7:10706 13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11143-x>.

Johnson, M.A.; Shatalov, O., The', J. L.; The', C. L. Wind Rose Plots for Meteorological Data – WRPLOT View. Freeware. Version 8.0.2. [S.l.]: Likes Environmental Software, 2018. Accessed on march 2, 2021

Marshak, S., Alkmim, F.F., Jordt- Evangelista, H. 1992. Proterozoic crustal extension and generation of dome-and-keel structure in Archean granite-greenstone terrane. *Nature*. 357: 491-493. <https://doi.org/10.1038/357491a0>.

Marta-Almeida, M., Mendes, R., Amorim, F. N., Cirano, M., & Dias, J. M. 2016. Fundão Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. *Marine Pollution Bulletin*, 112(1-2), 359–364. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.07.039

Martins, V.T.S., Teixeira, W., Noce, C.M., Pedrosa-Soares, A.C. 2004. Sr and Nd Characteristics of Brasiliano-Pan African Granitoid Plutons of the Araçuaí Orogen, Southeastern Brazil: Tectonic Implications. *Gondwana Res.* 7: 75-89. [https://doi.org/10.1016/S1342-937X\(05\)70307-5](https://doi.org/10.1016/S1342-937X(05)70307-5).

Martins, M., Karfunkel, J., Noce, C.M., Babinski, M., Pedrosa- Soares A.C., Sial A.N., Liu D. 2008. The Pre-Glacial Sequence of the Macaúbas Group in the standard area and the record of the opening of the Araçuaí rift. *Rev. Bras. Geociênc.* 38: 761–772. <https://doi.org/10.25249/0375-7536.2008384761772>.

Miranda, L.B., Castro, F.B.M. 1981. Geostrophic flow conditions of the Brazil Current at 19°S. *Ciência Interamericana*, 22(1-2): 44-48.

Nalini, H.A., Bilal, E., Paquette, J.-L., Pin, C., Machado, R. 2000. Géochronologie U–Pb et géochimie isotopique Sr–Nd des granitoïdes néoproterozoïques des suites Galiléia et Urucum, vallée du Rio Doce, Sud-Est du Brésil. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*. 331: 459-466. [https://doi.org/10.1016/S1251-8050\(00\)01440-3](https://doi.org/10.1016/S1251-8050(00)01440-3).

Noce, C.M., Teixeira, W., Quémeneur J.J.G., Martins, V.T.S., Bolzachini E. 2000. Isotopic signatures of paleoproterozoic granitoids from the southern São Francisco Craton and implications for the evolution of the Transamazonian Orogeny. *J South Am Earth Sci* 13: 225-239. [https://doi.org/10.1016/S0895-9811\(00\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0895-9811(00)00019-5)

Noce, C.M., Pedrosa-Soares, A.C., Silva, L.C., Alkmim, F.F. 2007. O embasamento Arqueano e Paleoproterozóico do Orógeno Araçuaí. *Geonomos*. 15 (1): 17-23. <https://doi.org/10.18285/geonomos.v15i1.104>.

Novo, T.A., Pedrosa-Soares, A.C., Noce, C.M., Alkmim, F.F., Dussin, I. 2010. Rochas Charnockíticas do sudeste de Minas Gerais: A raiz granulítica do Arco Magmático do Orógeno Araçuaí. *Revista Brasileira de Geociências*, 40(4): 573-592. <https://doi.org/10.25249/0375-7536.2010404573592>

Oliveira, E.P., Carvalho, M.J., Mc Naughton, N. 2004. Evolução do segmento Norte do Orógeno Itabuna- Salvador- Curaçá: cronologia da acreção de arcos, colisão continental e escape de terrenos. *Geol. USP. Sér. Cient.* 4(1): 41-53. <http://dx.doi.org/10.5327/s1519-874x2004000100003>.

Pedrosa-Soares, A.C., Noce, C.M., Wiedemann, C.M., Pinto, C.P., 2001. The Araçuaí–West Congo orogen in Brazil: An overview of a confined orogen formed during Gondwanaland assembly. *Precambrian Research* 110, 307–323

Peterson, R., Stramma, L. 1991. Upper-level circulation in the South Atlantic Ocean. *Progr. Oceanogr.* 26(1): 1–73. [https://doi.org/10.1016/0079-6611\(91\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0079-6611(91)90006-8).

Rodrigues, R.R., Rothstein, L.M., Wimbush, M., 2007. Seasonal variability of the south equatorial current bifurcation in the Atlantic Ocean: a numerical study. *J. Phys. Oceanogr.* 37, 16–30. <http://dx.doi.org/10.1175/jpo2983.1>.

Silveira, I.C.A., Schmidt, A.C.K., Campos, E.J.D., Godoi, S.S., Ikeda, Y.A. 2000. Corrente do Brasil ao Largo da Costa Leste Brasileira. *Rev. Bras. Oceanogr.* 48 (2): 171-183. <https://doi.org/10.1590/S1413-77392000000200008>.

Tedeschi M., Novo T., Pedrosa-Soares AC, Dussin, I. Tassinari C., Silva LC, Gonçalves L., Alkmim FF, Lana, C., Figueiredo C., Dantas E., Medeiros S., De Campos C., Corrales F., Heilbron M. 2016. The Ediacaran Rio Doce magmatic arc revisited (Araçuaí-Ribeira orogenic system, SE Brazil). *J. S. Am. Earth Sci.* 68: 167-186. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2015.11.011>

Valeriano, C.M., Neumann, R., Alkmim, A. R., Evangelista, H., Heilbron, Neto, C.A., Paravidini G.S.

2019. Sm–Nd and Sr isotope fingerprinting of iron mining tailing deposits spilled from the failed SAMARCO Fundão dam 2015 accident at Mariana, SE-Brazil. Applied Geochemistry. <https://doi.org/10.1016 /j.apgeochem.2019.04.021>.

Vilas Boas, G.S., Sampaio, F.J., Pereira, A.M.S. 2001. The Barreiras Group in the Northeastern coast of the State of Bahia, Brazil: depositional mechanisms and processes. An. Acad. Bras. Ciênc.73(3): 417-427.

SEDIMENTAÇÃO MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Alex Cardoso Bastos	Coordenador	UFES
Valéria da Silva Quaresma	Sub-Coordenador	UFES
Marcos Tadeu Orlando	Pesquisador	UFES
Caio Turbay	Pesquisador	UFSB

2. ESCOPO

O escopo do projeto envolve a investigação e monitoramento dos processos de aporte, dispersão e sedimentação na foz do Rio Doce e plataforma continental adjacente, bem como a caracterização e distribuição de habitats bentônicos ao longo da plataforma continental. O monitoramento prevê o estudo das variações espaço-temporais tanto do Material Particulado em Suspensão (MPS) quanto do sedimento superficial de fundo. Sedimentos superficiais de fundo serão caracterizados em termos de sua granulometria, composição e mineralogia, enquanto a concentração de MPS em diferentes profundidades será definida. O estudo da distribuição e caracterização dos habitats se dá em áreas pré-definidas com base nos aspectos de vulnerabilidade dos habitats presentes na plataforma continental atingida, objetivando contextualizar e definir os habitats existentes e impactados. A definição dos habitats se dá por mapeamento acústico do fundo marinho, classificação dos habitats e imageamento para parametrização dos padrões acústicos com verdades de campo. Como parte do escopo do projeto está a integração dos dados relativos aos processos sedimentares e sua relação com a distribuição dos habitats bentônicos.

3. OBJETIVO

Investigar e monitorar os processos de aporte, dispersão e sedimentação na foz do Rio Doce e plataforma continental adjacente, tanto do Material Particulado em Suspensão (MPS) quanto do depósito sedimentar de fundo. O objetivo desse projeto é investigar e caracterizar os principais habitats marinhos adjacentes à foz do Rio Doce

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Monitoramento Trimestral de MPS e Sedimento de Fundo

Coleta, processamento e análise de dados trimestrais coletados em 42 estações; determinação de concentração de MPS; determinação de granulometria, mineralogia de argila (em amostras pré-selecionadas), densidade do sedimento superficial, teor de CaCO₃ e de matéria orgânica (MO) dos sedimentos de fundo. Anualmente, serão feitas as mesmas análises para uma única campanha emergencial a ser definida.

META 2 – Mapeamento de Habitats

Mapear o fundo marinho em setores definidos, mostrando a relação entre morfologia, tipos de fundo e distribuição bentônica. A meta objetiva mostrar espacialmente os fundos mais sensíveis ao desastre, dando assim uma ideia das relações entre os processos e a comunidade bentônica. O mapeamento engloba levantamentos hidrográficos e coletas de dados de verdade de campo por imageamento.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Granulometria do sedimento superficial de fundo	Valéria Quaresma
- Teor de Carbonato de Cálcio do sedimento superficial	Marcos Tadeu Orlando
- Teor de Matéria Orgânica do sedimento superficial	Alex Bastos
- Concentração de Material Particulado em Suspensão	
- Mineralogia de argila das amostras de sedimento superficial	
- Mapa Morfológico do Fundo Marinho	
- Mapa de Backscatter do Fundo Marinho	
- Mapa de Habitats Bentônicos	
- Dados e Indicadores validados, planilhados e inseridos em uma base de dados	

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Mapa de habitats descrevendo a ocorrência de fundos sedimentares e recifais/rodolitos, determinando a área de cobertura de cada um, bem como a descrição de suas morfologias, estrutura e bentos associado.	Alex Bastos
- Análise espaço-temporal da variação do sedimento depositado (quanto a granulometria e composição), da distribuição do IMS, e do material particulado em suspensão (quanto a concentração) na plataforma Continental (trimestral).	
- Discussão da variabilidade do processo sedimentar considerando a integração dos dados sedimentares com os dados de fundeio hidrodinâmico.	Valéria Quaresma
- Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes e a relação com os habitats bênticos.	

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

O projeto temático Sedimentação Marinha aborda diferentes malhas amostras e frequências de coleta

de dados. A coleta de dados para determinação da concentração de material particulado em suspensão (MPS) e as propriedades físicas e mineralógicas do sedimento de fundo seguem parcialmente a malha amostral que integra as coletas de dados no ambiente marinho. A malha original é composta por 42 estações de coleta (incluindo dados de bentos, plâncton, geoquímica e físico-química da água, além de sedimentologia) (Figura 4). A frequência amostral é trimestral, com uma possível coleta extraordinária, definida como emergencial, que seria realizada nas estações adjacentes ao setor Foz apenas.

Com relação a malha amostra do mapeamento de habitats, a Figura 5 aponta para as áreas que estão programadas dentro do escopo definido para essa etapa de coleta de dados. A área total de mapeamento para esta etapa do programa compreende cerca de 1100km². A coleta de dados é contínua até o término das áreas. A coleta de dados de verdade de campo será feita em pontos que serão definidos após o mapeamento de setores. A previsão é que tenhamos campanhas de verdade de campo a cada mês.

Figura 4: Malha amostral das coletas trimestrais no ambiente marinho contemplando as coletas de sedimentologia.

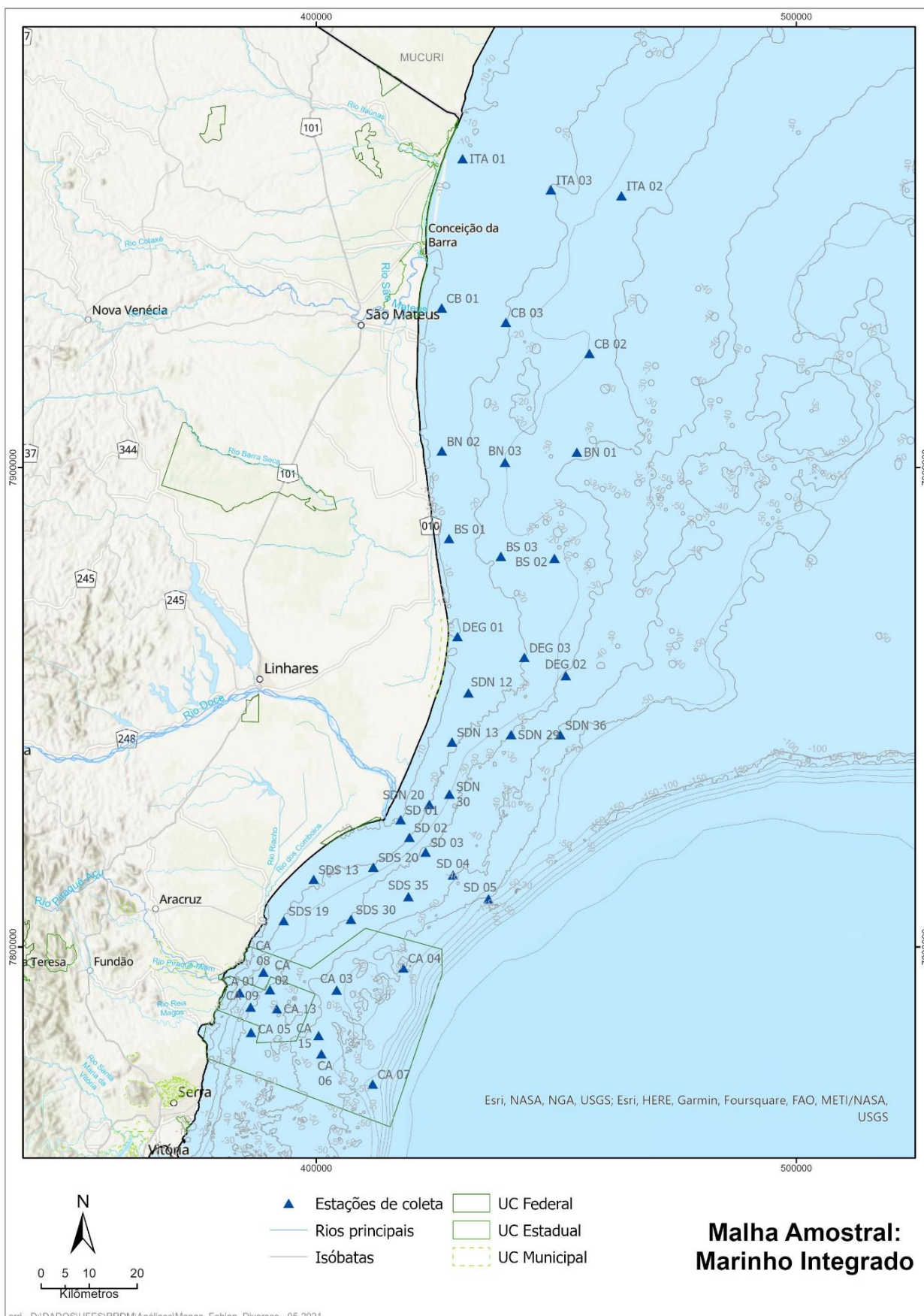
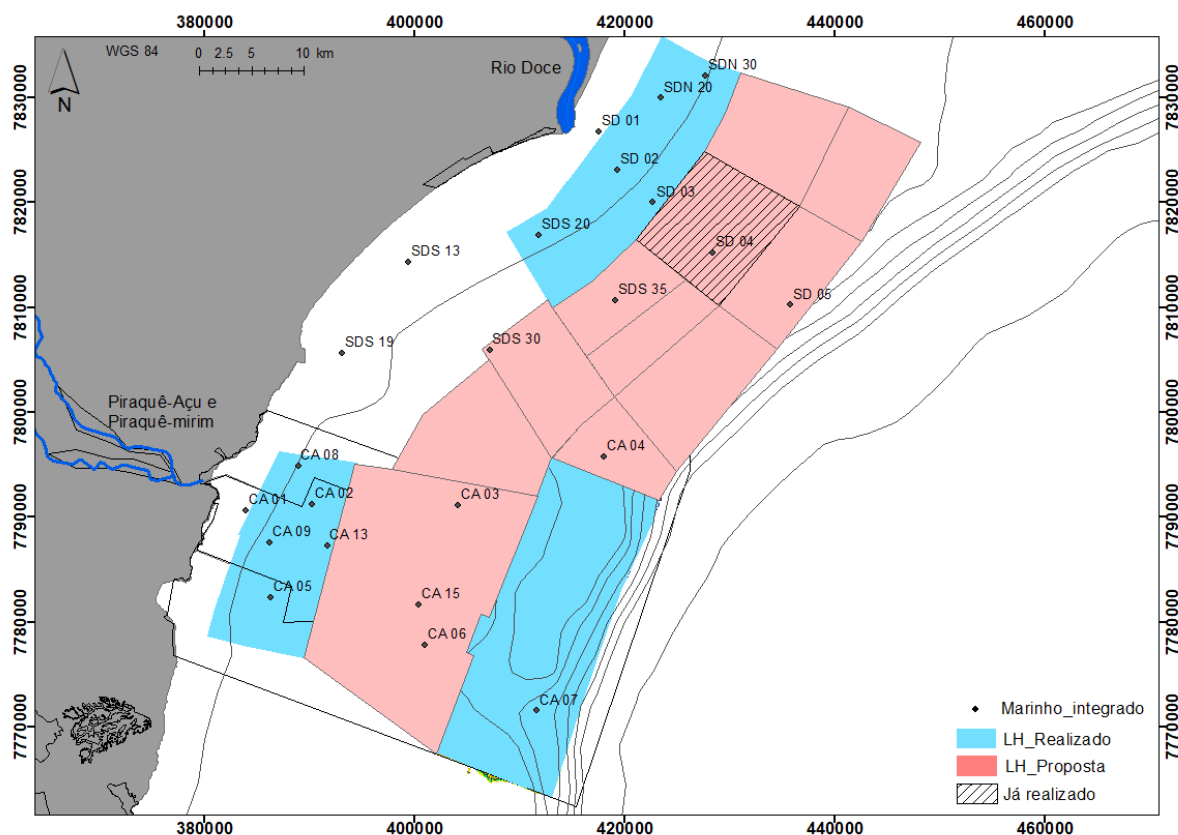


Figura 5: Mapa mostrando as áreas propostas para o mapeamento de habitats.



6.2. META 1 – Coleta de Amostras de Água e Sedimento

• Coleta de água para determinação de MPS

As amostras de água serão coletadas em 3 profundidades da coluna d'água por meio de garrafas de Van Dorn anexadas em um rack. Amostras de superfície serão coletadas entre 15 e 30 cm de profundidade; amostras do meio da coluna d'água serão coletadas na metade da profundidade de cada estação; e amostras do fundo da coluna d'água serão coletadas a cerca de 1 m acima do sedimento. Será coletado 1 L de água para cada profundidade mencionada. A água coletada será armazenada em garrafas de plástico de 1 L, devidamente limpas e identificadas, e acondicionadas sob refrigeração ($\approx 4^\circ\text{C}$) e ao abrigo da luz até análise do material particulado em suspensão no laboratório.

• Coleta de sedimento

As coletas de sedimento superficial serão realizadas com um amostrador de fundo do tipo Van Veen. Quando as amostras coletadas se apresentarem lamosas, uma alíquota para a análise de densidade do sedimento superficial (primeiro centímetro do pacote) será subamostrada e armazenada em um pote de 5 mL. As amostras de sedimento e de densidade serão acondicionadas sob refrigeração ($\approx 4^\circ\text{C}$) e ao abrigo da luz até análise em laboratório.

6.3. META 1 – Análise de Água e Sedimento

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

O processo de filtragem das amostras de água será realizado em filtros de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro e poro 0,45µm, previamente secos em estufa à 40°C por 24h, para determinação de seu peso original. Após a filtragem das amostras, os filtros serão novamente levados à estufa à 40°C por 48h e pesados para a determinação do peso do MPS retido. A concentração do MPS será calculada através da diferença entre o peso do filtro antes e após a filtração, corrigido pelo volume filtrado de cada amostra (Mitchell et al., 2017). Após a determinação do MPS, os filtros seguirão para queima da matéria orgânica por combustão em mufla à 450°C por 4h (Mook e Hoskin, 1982) para a determinação do teor de matéria orgânica (MO) do MPS.

- **Análise de Sedimento Superficial de Fundo**

Em laboratório, as amostras serão lavadas até a completa remoção de sal e depois serão secas em estufa à 40°C para aquisição do peso seco. A separação das frações grossas e finas será realizada através do método de separação via úmida pela lavagem do sedimento com água destilada em uma peneira de malha com abertura de 63 µm. O sedimento que passa pela peneira é a fração fina (ou lama), enquanto que o retido é a fração grossa (areia e cascalho) (Dias, 2004).

A determinação da granulometria das frações grossas (> 63 µm) será realizada pelo método de peneiramento via seca com peneiras intercaladas por malhas com abertura de 0,5 em 0,5 phi. Para as frações finas (< 63 µm) a granulometria será determinada por um analisador de partículas à laser (Malvern Mastersizer 2000), também de 0,5 em 0,5 phi, após queima da matéria orgânica com peróxido de hidrogênio, para evitar floculação e alteração da granulometria durante a análise. Os parâmetros granulométricos utilizados serão o diâmetro mediano do grão (D50) e o percentil 90 da amostra (D90), que serão calculados pelo software Gradistat 8.0 (Blott e Pye, 2001) versão para Excel 2007-2010.

O teor de matéria orgânica do sedimento será determinado pelo método de combustão em mufla à 450°C por 4h (Mook e Hoskin, 1982). O teor de carbonato de cálcio (CaCO₃) será determinado a partir da queima com ácido clorídrico (30%) (Dias, 2004; Komada et al., 2008; Quaresma et al, 2015) e a apresentação gráfica será feita em % com o eixo Y padronizado ao limite de 100%. Para a descrição ao longo do texto serão utilizadas as médias com os respectivos desvios padrão para dados de teores de cascalho, areia, lama, CaCO₃ e MO do sedimento superficial.

- **Análise de Densidade**

A amostragem será feita de forma a coletar apenas a camada superficial de lama do pacote sedimentar. Como esta metodologia é aplicada apenas para sedimento lamoso, quando o sedimento coletado pelas dragas se apresenta arenoso, a amostragem para esta análise não é realizada. Após coleta, as amostras são acondicionadas em recipientes de 5mL, previamente pesado em balança de precisão (4 casas decimais), e mantidas resfriadas até chegada ao laboratório. Em laboratório, os recipientes são pesados para obtenção do peso úmido e, então, levados à estufa à 40°C por 48h ou até a amostra estar completamente seca. Após essa etapa, os recipientes contendo as amostras, já secas, são

novamente pesados. Para a determinação da densidade do sedimento superficial de fundo será utilizado o método descrito por Amos e Sutherland (1994; Soulsby, (1997), onde a densidade é igual a massa úmida dividida pelo volume da mesma. Os dados serão apresentados sob a forma de densidade e em kg/m^3 e será indicada presença de lama fluida quando for o caso (McAnally et al., 2007; Winterwerp e Kersteren, 2004).

- **Análise Mineralógica**

As análises mineralógicas serão realizadas nas frações lamosas (tamanho do grão $< 0,63 \mu\text{m}$), após peneiramento via úmida dos sedimentos de fundo (metodologia de separação descrita anteriormente). O limite de detecção é relacionado ao sinal/ruído das amostras quando lidas pelo difratômetro. Dessa forma, o limite de detecção de medidas mais simples é de 2,5% e nas mais apuradas é de 0,5%. No protocolo de análises laboratoriais estabelecido, após 2 horas no difratômetro, os resultados são comparados aos resultados obtidos nas análises de anos anteriores. Havendo discrepâncias, as amostras seguem para análise em fluorescência de Raios-X para determinação química elementar e são novamente submetidas à difratometria por período de 14 horas. Uma vez confirmados os resultados, as amostras seguem para análise de susceptibilidade magnética.

O procedimento analítico interpretativo das fases minerais, na difratometria de Raios-X, tem como fontes principalmente fichas e bases minerais existentes na literatura e WEB, onde são listados parâmetros relativos aos distanciamentos dentro dos retículos cristalinos, além das relações angulares e axiais em diferentes espécies minerais. Neste sentido, o volume relativo de fases minerais percentualmente pode ser verificado através das áreas dos picos de intensidade do sinal por comparação entre picos de espécies diferentes (refinamento Rietveld).

Seguindo a convenção usual para representação geoquímica elementar de rochas e sedimentos (Rollinson, 1993), os elementos nos resultados das análises de fluorescência de Raios-X estão expressos em óxidos e recalculados para 100% em peso em base anidra. O ferro total está expresso em $\text{FeO}_{\text{total}}$. São considerados minerais essenciais aqueles que são superiores a 10%. Os minerais acessórios são aqueles que possuem teores menores que 10% e maiores que 1%. Os minerais que apresentam teores $< 1\%$ são considerados traços. O erro máximo encontrado até o momento através desta técnica é de $\pm 5\%$ em volume. A química por fluorescência de raios-X complementa as informações da difração, fornecendo os principais constituintes químicos presentes em porcentagem em peso e partes por milhão (ppm), além de parâmetros quantitativos ao longo do tempo. A montagem que realiza a medida da susceptibilidade magnética ac (χ_{ac}) será totalmente construída na UFES, onde a precisão de configuração é de 1 ppm.

Os resultados serão ratificados pelas medições de susceptibilidade magnética nas fases minerais que contém ferro (principalmente óxidos e hidróxidos). Os dados adquiridos em amostras prévias ao rompimento da barragem (2012) foram utilizados como amostras controle para fins de comparação, nomeadas de valor de referência (D´Azeredo Orlando et al., 2020). Os mapas indicativos da distribuição espacial de fases minerais com ferro ($\text{FeO}_{\text{total}}$) e susceptibilidade magnética serão elaborados no software livre QGIS 2.18.

A verificação da presença do rejeito da Barragem de Fundão em sedimentos marinhos será realizada através do reconhecimento do aumento relativo total de fases minerais como hematita, goethita, grenalita-T, maghemita e magnetita, as quais representam óxidos de ferro e silicatos contendo ferro das amostras analisadas (suíte de minerais com ferro), comparativamente aos dados de amostras anteriores ao rompimento da barragem (D'Azeredo Orlando et al., 2020). Da mesma forma, serão verificados aumentos nas susceptibilidades magnéticas totais e nas quantidades totais de ferro (FeOtotal) (D'Azeredo Orlando et al., 2020). Para caracterização da química mineral serão considerados como parâmetro o ferro total (FeOtotal), a alumínio (Al₂O₃), a sílica (SiO₂) e o cálcio (CaO) por representarem os principais componentes presentes nas fases minerais encontradas nas amostras identificadas.

6.4. META 2 – Aquisição e Processamento de dados Acústicos e Verdades de Campo (Mapeamento de Habitats)

O escopo desta meta é o mapeamento de habitats de setores já definidos na proposta. Estes setores irão conectar as 3 áreas já mapeadas desde o início do PMBA-TR4. Os setores serão mapeados com batimetria de varredura e coleta de verdade de campo através de imagens de alta resolução a serem obtidas por dropcameras, ROVs portáteis e/ou tow-cameras. Em havendo necessidade, sedimentos de fundo serão coletados com busca-fundo van veen.

A região a ser mapeada contempla a integração/conexão das 3 áreas mapeadas durante os 3 primeiros anos, com enfoque na região entre a foz do Rio Doce e a APA Costa das Algas. O levantamento será realizado com um sistema de multibeam já adquirido pelo projeto. O sistema terá alta resolução para áreas com profundidades entre 10 e 200m, aquisição de backscatter e correção inercial. As linhas devem ter cerca de 30% de recobrimento e a área a ser definida terá 100% de cobertura.

A verdade de campo será realizada por meio de dropcameras em pontos pré-estabelecidos que precisam de verificação. Em alguns casos, o uso de ROV ou towcameras poderá ser usado para imageamento em transectos, ilustrando alterações no habitat. Em havendo necessidade, amostras de fundo poderão ser coletadas com busca-fundo van veen e serão analisadas para granulometria, seguindo a metodologia já descrita acima.

O processamento e análise dos registros batimétricos e de backscatter serão realizados utilizando os softwares Qimera, Fledermaus, FMGT, Caris Hips and Sips e Arcgis.. Os dados de backscatter serão processados visando o mapeamento dos tipos de fundo. Os dados acústicos serão segmentados usando de fermenta OBIA. A parametrização a partir da verdade de campo será feita através da relação dos índices de backscatter e derivativos de terreno com os resultados das análises de imagem. Análises multivariadas e de agrupamento serão usadas para definição das classes de habitats. Todo o processamento acústico, segmentação e processamento das imagens de vídeos seguirá o que foi feito nos últimos 3 anos e está descrito no protocolo de análise de dados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOS, C.L.; BERGAMASCO, A.; UMGIESSER, G.; CAPPUCCI, S.; CLOUTIER, D.; DENAT, L.; FLINDT, M.; BONARDI, M.; CRISTANTE, S. The stability of tidal flats in Venice Lagoon—the results of in-situ measurements using two benthic, annular flume. *Journal of Marine Systems*, 51, 211-241, 2004.

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

D'AZEREDO ORLANDO, MARCOS TADEU ; GALVÃO, ELSON SILVA ; SANT'ANA CAVICHINI, ARTHUR ; GABRIG TURBAY RANGEL, CAIO VINÍCIUS ; PINHEIRO ORLANDO, CINTIA GARRIDO ; GRILO, CAROLINE FIÓRIO ; SOARES, JACYRA ; SANTOS OLIVEIRA, KYSSYANNE SAMIHRA ; SÁ, FABIAM ; JUNIOR, ADEILDO COSTA ; BASTOS, ALEX CARDOSO ; DA SILVA QUARESMA, VALERIA . Tracing iron ore tailings in the marine environment: An investigation of the Fundão dam failure. *CHEMOSPHERE* , v. 257, p. 127184, 2020.

DIAS, J.A. A análise Sedimentar e os Conhecimentos dos Sistemas Marinhos, Universidade do Algarve Faro, Portugal, 84 p., 2004.

KOMADA, T.; ANDERSON, M. R.; DORFMEIER C. L. Carbonate removal from coastal sediments for the determination of organic carbon and its isotopic signatures, $\delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{14}\text{C}$: comparison of fumigation and direct acidification by hydrochloric acid. *Limnology and Oceanography Methods*, 6, 254–262, 2008.

MCANALLY WILLIAM, H.; FRIEDRICHS, C.; HAMILTON, D.; HAYTER, E.; SHRESTHA, P.; RODRIGUEZ, H.; SHEREMET, A.; TEETER, A. Management of Fluid Mud in Estuaries, Bays, and Lakes. I: Present State of Understanding on Character and Behavior. *Journal of Hydraulic Engineering*. 133, 9-22, 2007.

MITCHELL, S. B.; UNCLES, R. J.; STEPHENS, J. A. Suspended Particulate Matter: Sampling and Analysis. In: Uncles, R. J.; Mitchell, S. B. *Estuarine and Coastal Hydrography and Sediment Transport*. Cambridge: Cambridge University Press, 2017. cap. 7, p. 179-210.

MOOK, D. H.; HOSKIN, C. M. Organic determinations by ignition: caution advised. *Estuarine and Coastal, Shelf Science*. 15: 697–699, 1982.

QUARESMA, V.S.; CATABRIGA, G.; BOURGUIGNON, S.N.; GODINHO, E.; BASTOS, A.C. Modern sedimentary processes along the Doce River adjacent continental shelf. *Brazilian Journal of Geology*. 45, 10, 2015.

ROLLINSON, H. Using geochemical data: evaluation, presentation, interpretation. Longman Group U. K. (Edit.), England, 350 p., 1993.

SOULSBY, R. Dynamics of Marine Sands A Manual for Practical Applications. Thomas Telford, London, 1997.

WINTERWERP, J. C.; VAN KESTEREN, W. G. M. Introduction to the Physics of Cohesive Sediment Dynamics in the Marine Environment, 1 Ed. Elsevier, Amsterdam. 466p., 2004.

HIDROGEOQUÍMICA MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Renato Rodrigues Neto	Coordenador	UFES
Fabian Sá	Coordenador	UFES
Cybelle Menolli Longhini	Pesquisadora	UFRN
Eduardo Schettini Costa	Pesquisador	UFES
Renata Caiado Cagnin	Pesquisadora	UFES
Cesar Alexandro da Silva	Pesquisador	UFES
Rayana Alvarenga Costa	Técnica	UFES
Bethania Dal Col Lehrback	Técnica	UFES
Iasmim de Deus Gargur Leal	Técnica	UFES
Elisa Milan Chaves de Oliveira	Técnica	UFES
Caroline de Cassia Matos Hermogenes	Técnica	UFES
Nathalia Machado Betzel	Técnica	UFES
Ricardo da Cunha Bisi Junior	Técnico	UFES
Weber Adao Rodrigues Luz Junior	Técnico	UFES
Gabriele Wanderley Ferreira	Técnica	UFES
Clarissa Heideriqui Comerio	Pesquisadora	UFES
Karoline dos Santos Tavares	Pesquisadora	UFES
Beatriz Rodrigues Clementino Voria	Pesquisadora	UFES
Mateus Alves Jesus	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

Este tema tem como escopo monitorar componentes químicos para avaliação da qualidade do ambiente marinho atingido pelo rejeito de minério da Barragem de Fundão, tanto na região da foz do Rio Doce, quanto na APA Costa das Algas/RVS Santa Cruz ao sul da foz e no Setor Norte da Foz, abrangendo diversas áreas de preservação ambiental.

Uma das metas deste tema é avaliar as concentrações de nutrientes na água do mar, fornecendo subsídios para o entendimento do equilíbrio ambiental com base nas comunidades planctônicas. Além disso, é possível fazer associações da influência do rejeito no aumento das concentrações dos nutrientes em relação aos dados pré-Rompimento da Barragem. Também faz parte do escopo deste tema a análise isotópica e elementar de carbono e nitrogênio que auxiliam na compreensão dos parâmetros-chave abióticos e bióticos.

Outra meta para o escopo de monitoramento de componentes químicos é a realização da avaliação da concentração de metais, arsênio e elementos terras raras (ETR) através de análises em amostras de água e sedimentos marinhos, em suas diferentes frações, a serem coletados na foz do rio Doce e áreas adjacentes neste projeto. Esta meta busca verificar alterações no aporte dos elementos analisados e sua dinâmica no sistema, relacionando com as condições pré-Rompimento da Barragem e a processos bióticos e abióticos.

Dentro do escopo de monitoramento, serão realizadas análises de compostos orgânicos em água e sedimento, tais como aminas, hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos,

esteróis e ácidos graxos. Para esta avaliação, serão considerados pontos conforme malha amostral do ambiente marinho, relacionando os resultados obtidos com o aporte destes compostos através da descarga fluvial, seja diretamente associado ao rejeito de minério ou impactos secundários, ou por alterações em suas fontes marinhas. Também serão verificadas a dinâmica de dispersão espaço-temporal destes contaminantes e os possíveis efeitos frente a processos bióticos e abióticos.

3. OBJETIVO

Monitorar os componentes químicos para caracterização do impacto do rejeito de minério de ferro da Barragem de Fundão e avaliação da qualidade ambiental, tendo como base comparativa os dados pretéritos da região, tanto para a matriz água quanto para a matriz sedimento.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Análise de nutrientes, isótopos e elementar de carbono (C) e nitrogênio (N)

Determinar a concentração dos nutrientes totais e dissolvidos, bem como do carbono dissolvido em amostras de água do mar, e realizar análises isotópicas e elementares de carbono e nitrogênio no sedimento superficial da foz do Rio Doce e áreas adjacentes conforme malha aprovada para o ambiente marinho, visando avaliar suas variações espaço-temporais e subsidiando a interpretação dos dados abióticos e bióticos do PMBA.

META 2 – Análise de Metais

Realizar as análises de metais em amostras de água e sedimentos, em suas diferentes frações, a serem coletados na foz do rio Doce e áreas adjacentes conforme malha amostral do ambiente marinho. Esta meta busca verificar alterações no aporte destes elementos e sua dinâmica no sistema, relacionando com processos bióticos e abióticos do PMBA.

META 3 – Análise de Orgânicos

Realizar as análises de compostos orgânicos em amostras de água e de sedimento superficial a serem coletados na foz do rio Doce e áreas adjacentes conforme malha amostral do ambiente marinho, relacionando os resultados obtidos com o aporte destes compostos através da descarga fluvial, seja diretamente associado ao rejeito de minério ou impactos secundários, ou por alterações em suas fontes marinhas.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Nutrientes dissolvidos (sílica, fosfato, nitrito, nitrato e amônia), nutrientes totais (nitrogênio e fósforo);	Renato Neto
- Metais (V, Co, Ni, Cu, As, Ag, Cd, Ba, Pb, Cr, Fe, Al, Mn, Zn, Hg; Lantanídeos);	Renato Neto
- Orgânicos (Aminas, Hidrocarbonetos, HPAs, esteróis e ácidos graxos);	Renato Neto
- Dados auxiliares (Carbono orgânico dissolvido, isótopos de C e N, elementar C e N, pH e ORP).	Renato Neto

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Análise espaço-temporal da variação das concentrações de nutrientes, metais e orgânicos nas diferentes matrizes e frações ambientais analisadas na foz do Rio Doce e regiões adjacentes;	Renato Neto Fabian Sá
- Análise dos resultados obtidos em comparação com dados pretéritos para a região monitorada.	

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral (metas 1, 2 e 3)

6.2. Procedimento para água marinha (metas 1, 2 e 3)

A coleta de água ao longo da coluna d'água deverá ser feita com garrafa horizontal e seguir a denominação de superfície (0 a 15cm) e fundo (cerca de 50cm acima do fundo). São realizadas análises hidrogeoquímicas de nutrientes, metais, orgânica e dados auxiliares nesta matriz. Uma alíquota da água coletada é preservada integralmente para análise das frações totais dos elementos e outra alíquota é filtrada em campo para análise das frações dissolvidas e particuladas (MPS) dos elementos.

- Recipientes para armazenamento das amostras:

São utilizados frascos de polietileno (metais, nutrientes e carbono dissolvido) e de vidro (aminas), todos de primeiro uso, devidamente identificados, descontaminados, de boca estreita e tampa de rosca. Coletar, em frascos separados:

- 500 ml de água filtrada para análise de metais dissolvidos;
- 250 ml de água não filtrada para análise de metais totais;
- 125 ml de água não filtrada para análise de nutrientes totais;
- 125 ml de água filtrada para análise de nutrientes dissolvidos;
- 125 ml de água filtrada para análise de carbono orgânico dissolvido;
- 1000 ml de água não filtrada para análise de aminas.

- Limpeza e descontaminação dos recipientes:

- Rinsar 2 vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido nítrico P.A. para metais;
- Rinsar 2 vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido clorídrico P.A. para nutrientes e carbono dissolvido;
- Rinsar 2 vezes os frascos novos com acetona concentrada P.A. para aminas;
- Lavar 3 vezes com água desmineralizada;
- Rinsar com água milli-Q;
- Deixar secar antes de usar.

- Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de água de mar coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização das garrafas oceanográficas;
- Utilização de luvas pelos operadores;
- Descartar amostras onde a garrafa é recuperada parcialmente preenchida com água (reparar ou trocar a garrafa);

- Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação da garrafa (descontaminar ou trocar a garrafa).

- Processamento e conservação das amostras em campo

As amostras para análise de metais, nutrientes e carbono dissolvidos são filtradas em campo, por meio de uma bomba a vácuo e membranas de filtragem de acetato de celulose 0,45 µm.

As amostras de nutrientes totais e dissolvidos e carbono dissolvido são congeladas a -20 °C até as análises.

Amostras para metais na água deverão ser preservadas pela adição de ácido nítrico suprapuro até pH<2 e, em seguida, deverão ser refrigeradas a 4 °C até o processamento em laboratório.

As amostras para análise de aminas são mantidas refrigeradas a 4°C até o processamento em laboratório.

São filtrados 1000ml de água do mar para recuperação do MPS para análise do metal particulado. Este material retido no filtro é mantido congelado até o processamento em laboratório.

Obs1: Não encher totalmente os frascos.

6.3. Procedimento para sedimento (metas 1, 2 e 3)

Deve ser coletado a camada superficial do sedimento (~2cm) com auxílio de uma espátula plástica e acondicionadas em potes de plástico, no caso dos metais; e com o auxílio de uma espátula de metal acondicionadas em recipientes de alumínio calcinados, no caso dos compostos orgânicos, sendo posteriormente congeladas a -20 °C até o processamento no laboratório.

Obs1: Todo o material utilizado na coleta deve ser previamente descontaminado.

6.4. Procedimentos para análise das amostras de água e de sedimentos

6.4.1. Nutrientes (Meta 1)

Os nutrientes totais e dissolvidos são analisados por colorimetria em Análise de Fluxo Segmentado - Análise de Fluxo Contínuo (SEAL AutoAnalyzer3 High Resolution - AA3HR). O circuito analítico para a determinação automática consiste em canais individuais para cada nutriente com configuração própria de injeção dos reagentes para o tempo adequado de reação. Todos os nutrientes são obtidos de acordo com o método de GRASSHOFF et al. (1999). Nitrito e nitrato são determinados por diazotização a 543 nm λ_{max} de comprimento de onda, com redução do nitrato em coluna de Cd-Cu (recuperação > 95%). O fosfato (como HPO_4^{3-}) é determinado pelo método fosfomolibdico (810 nm λ_{max}); a amônia (NH_3^+ e NH_4^+) é determinada pelo complexo de coloração azul-esverdeada formado pelo salicilato e medido a 600 nm λ_{max} ; e o silicato (como H_3SiO_4) é determinado pelo método silicomolibdico a 885 nm λ_{max} .

O nitrogênio e fósforo totais são analisados após a digestão em condições ácidas por um oxidante forte, o Persulfato de Potássio, onde compostos orgânicos de nitrogênio são oxidados a nitrato e fósforo orgânico a ortofosfato (VALDERRAMA, 1981). Para que a oxidação ocorra, é necessário um intermediário alcalino (hidróxido de sódio) para os componentes de nitrogênio e um ácido (ácido bórico) para os componentes fosfóricos. A digestão é realizada a 120°C em autoclave por 2 horas. Após a digestão o fósforo e o nitrogênio são determinados pelo método colorimétrico descrito acima e as leituras são realizadas no AA3HR.

6.4.2. Metais (Meta 2)

- Metais em água

Metais totais em água

Para a extração dos metais totais nas amostras de água será utilizado o método EPA 3015A, o qual consiste em adicionar 4 ml de HNO₃ destilado (Sub-boiling) + 2ml de HCl em uma alíquota de 45ml da amostra (água), sendo em seguida aquecidas em forno micro-ondas. A quantificação dos elementos analisados foi realizada pelo método EPA 6020A empregado técnicas de ICP-MS.

Metais dissolvidos

A amostra é filtrada em membrana de porosidade 0,45µm, sendo uma alíquota recolhida, acidificada (pH<2) com adição de HNO₃ destilado (Sub-boiling) e armazenada até análise. A amostra acidificada será neutralizada e passada em colunas contendo resina catiônica (Chelex®) para pré-concentração e a eliminação de sódio (Na), devido à quantificação ser realizada em ICP-MS, minimizando possíveis interferências durante a etapa de quantificação de metais. A quantificação dos elementos analisados foi realizada pelo método EPA 6020A empregado técnicas de ICP-MS.

- Metais no material particulado em suspensão

O material particulado em suspensão (MPS) será obtido através da filtração de uma alíquota de amostra da água marinha através de membrana filtrante de acetato de celulose com porosidade de 0,45µm. O material retido pela membrana será caracterizado quanto a sua composição geoquímica através das análises descritas abaixo.

Metais parciais

Na membrana saturada pelo MPS será adicionado 10ml de HNO₃ destilado (sub-boiling) e aquecidas em forno micro-ondas (EPA 3051A). Após o término do período de digestão ácida, as amostras são filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

- Metais em sedimentos

Extração total (Elementos Terras Raras)

A decomposição das amostras de sedimentos para análise metais totais será realizada pela abertura

total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (sub-boiling) e HNO₃ destilado (sub-boiling). Em 0,25g de sedimento, previamente liofilizado e macerado, será adicionado 10ml desta mistura de reagentes e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras são filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

Extração parciais

Para análise de metais parciais será utilizado o método EPA 3051A (Extração parcial). 0,25g de sedimento será liofilizado e macerado (gral e pistilo de ágata), sendo adicionado 10ml de HNO₃ destilado (sub-boiling) e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras são filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

6.4.3. Compostos Orgânicos (Meta 3)

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

São estudados todos os compostos orgânicos listados pelas normativas ambientais regidas pelo CONAMA para água e sedimento. Sendo assim, será avaliada a presença de Hidrocarbonetos, tanto os de origem biogênica quanto antrópica (HC) e Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) a fim de avaliar a entrada de material relacionado a atividade antrópica. Com o objetivo de melhor avaliar a geoquímica sedimentar e se os processos diagenéticos são modificados em função do aporte do material de rejeito, são determinados biomarcadores lipídicos tais como: ácidos graxos e esteróis. Também será verificada a presença de amins tanto éter amins graxas, quanto amins aromáticas a fim de serem utilizadas como marcadores moleculares do material oriundo da barragem de rejeito.

As amostras recebidas após as campanhas de coleta são armazenadas refrigeradas (amostras de água) e em freezer (amostras de sedimento) até os procedimentos laboratoriais para a determinação de hidrocarbonetos. Amostras de sedimento recebida são liofilizadas e posteriormente homogeneizadas por maceração com auxílio de grau e pistilo. As metodologias a serem utilizadas para a extração e determinação de hidrocarbonetos de petróleo, HPA e biomarcadores são 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 são adicionados em cartuchos de celulose e extraídos em Soxhlet (12 h / 250 mL de diclorometano). A fim de verificar a eficiência de extração são adicionados às amostras no início da extração, padrões *surrogates* deuterados (5 µg n-C_{20d}, 5 µg n-C_{24d} e 5 µg n-C_{30d} e 100 ng de p-terfenil-d14). Após a obtenção do extrato bruto, este será reduzido para o volume de aproximadamente 1 mL em evaporador rotatório e reservados para posterior fracionamento. Os processos de *clean up* e fracionamento dos extratos são realizados 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 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 são concentradas em evaporador rotativo e o solvente trocado por hexano ajustado a aproximadamente 1 mL. Em seguida são adicionados respectivamente na F1 e F2 os padrões internos n-C_{16d} (5 µg / mL) e um mix de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos deuterados (100 ng / mL) para a determinação dos hidrocarbonetos de petróleo e HPA, respectivamente. Para a quantificação de biomarcadores como esteróis e ácidos presentes nas frações F3 e F4 será utilizado o alfa-colestano como padrão interno. A quantificação e identificação dos compostos será realizada através de um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890 com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890 acoplado a espectrômetro de massas 5975c, ambos equipados com auto amostradores CTC Combi Pal, injetor *Split/splitless* e coluna capilar DB-5MS (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos 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-C_{16d} – 10 µg / mL). A programação de temperatura é 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 são as mesmas citadas, 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 é realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas são 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 16 HPA prioritários, assim como dos seus respectivos padrões internos, estão descritos na Tabela 1. Os HPA são determinados através do monitoramento full scan (*m/z* 50-550) e do monitoramento de íons selecionados (SIM), seguindo as seguintes características: 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 são utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. Os demais compostos identificados são determinados em função do padrão interno adicionado, devido a inexistência de padrões comerciais referentes as classes a serem avaliadas.

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

Tabela 1: 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
Fenantreno	178	Fenantreno-d10	188
Antraceno	178	Fenantreno-d10	188
Fluoranteno	202	Fenantreno-d10	188
Pireno	202	Criseno-d12	236, 240
Benzo(a)antraceno	228	Criseno-d12	236, 240
Criseno	228	Criseno-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	Criseno-d12	236, 240

Verificações periódicas referentes a resposta analítica do sistema cromatográfico são feitas 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 são realizados como controle de garantia das análises.

Valores de recuperação obtidos na faixa entre 70 e 120 % são considerados aceitos como índices de bom desempenho analítico para o método. Cada batelada de extração deve 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, são realizadas análises de amostras de sedimento certificado de referência (Standard Reference Material NIST 1941b).

- Éter-aminas e aminas aromáticas

Amostras de sedimento liofilizado (10 g) fortificados com trifetilamina são extraídas com diclorometano por sonicação (3 x 15 mL) ou por Soxhlet (250 mL) por 12 horas (metodologia baseada em Alzaga et al. 1999). A fração dissolvida de amostras de água (1000 ml) são passadas 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. Após, são submetidas a 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 realizada por cromatografia em fase gasosa equipado com um espectrômetro de massas e amostrador automático. Injeção realizada no modo splitless, (ativação em 40 s em 280°C). Hélio utilizado como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno 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. Colunas analíticas utilizadas: DB-5 de 30m, ID 0,25 mm e espessura de filme 0,25 mm (J & W Scientific). GC-MSD no modo eV EI operando no modo full scan (40-550 uma),

temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente.

6.4.4. Dados Auxiliares (Meta 1)

- Análise de carbono dissolvido na água

O teor de Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) é obtido a partir de amostras de água filtrada através de injeção direta no analisador de carbono orgânico total (TOC-L/CPN-SHIMADZU). O carbono total dissolvido da amostra é detectado como dióxido de carbono em um detector infravermelho não dispersivo (NDIR) após oxidação catalítica de alta temperatura (HTCO).

- Isótopos de C e N no sedimento

Isótopos estáveis: Na avaliação do aporte orgânico para os sedimentos da região costeira, a amostra é descarbonatada com o uso de HCl 10%, lavada com água ultrapura e centrifugada para a remoção do sobrenadante. O residual é seco por liofilização e a análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio (sem a remoção do carbono inorgânico) será 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 é referenciada contra o material padrão seguindo a fórmula a seguir:

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

Sendo, R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

- Elementar C e N no sedimento

A caracterização da matéria orgânica será realizada através de análises sobre a composição de seus elementos majoritários, a predominância isotópica entre eles e as moléculas que formam. As análises da composição elementar (C e N) nos sedimentos deste estudo são realizadas após a descarbonatação, através da adição de HCl 1,0 mol L⁻¹ diretamente nas amostras dentro dos frascos de análises. Este procedimento é então 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) são realizadas 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 são realizados com padrão certificado.

- pH e ORP *in situ*

As medidas de potencial hidrogeniônico (pH) e potencial redox (ORP) em sedimentos superficiais são feitas por um pH Mobile 826 Metrohm por meio da imersão do eletrodo na água intersticial drenada em frascos de acrílico imediatamente após a amostragem do sedimento pela draga Van Veen.

A calibração foi realizada diariamente a bordo com três buffers (7, 4 e 9, nesta sequência) pelo reconhecimento automático do eletrodo e correção da temperatura. As faixas técnicas de medição são: pH de -8 a 22; ORP de ±1200 mV a ±1200 mV e temperatura de -5 °C a +250 °C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. Methods of seawater analysis. 3ªed. Pag. 253 159-228, 1999.

USEPA. Method 3015A: Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3015a.pdf>USEPA.

USEPA. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf>.

USEPA. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>.

USEPA. Method 6020A: Inductively coupled plasma - mass spectrometry. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-6020a.pdf>.

VALDERRAMA, J.C. The Simultaneous Analysis of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Natural Waters. Marine Chemistry, 10, 109-122, 1981.

FITOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Paulo Sérgio Salomon	Coordenador temático	UFRJ
Stéfano Zorzal de Almeida	Coordenador temático	UFES
Arthur Weiss da Silva-Lima	Pesquisador, técnico vinculado	UFRJ
Georgette Cristina Salvador Lázaro, Profissional Sênior	Pesquisador	UFES
Kassia do Nascimento Lemos, Profissional Pleno I	Pesquisador	UFES
Mariana Magnago Alves, Profissional Pleno I	Pesquisador	UFES
Brener Freitas de Alvarenga, Profissional Junior	Pesquisador	UFES
Ana Regia Depoli Cabral de Macedo, Profissional Junior	Pesquisador	UFES
Tatiana V. Viana, Mestre II / Profissional Pleno II	Pesquisador	UFRJ
Kryna Stephanny de Moraes Ferreira, Pós-doutorado	Pesquisador	UFES
Márcio M. B. Tenório, Pós-doutorado	Pesquisador	UFRJ
Paulo liboshi Hargreaves, Pós-doutorado	Pesquisador	UFRJ
DCTI - Doutorando (DCTI), a definir	Pesquisador	UFRJ
DCTI - Mestrando (DCTI), a definir	Pesquisador	UFRJ
Iniciação Científica, Myllena da Silva Pereira	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica, a definir	Pesquisador	UFRJ
Iniciação Científica, a definir	Pesquisador	UFRJ

2. ESCOPO

O presente projeto faz parte do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Região Ambiental 1 (PMBA), que monitora os ecossistemas aquáticos dulcícolas da Bacia do Baixo Rio Doce e os ambientes marinhos e costeiros associados afetados pelo aporte do rejeito de mineração do rompimento da barragem de Fundão (MG). O escopo do tema é monitorar as comunidades fitoplânctônica e bacterioplânctônica na região marinha adjacente à foz do Rio Doce, da APA Costa das Algas, ao sul, até a região dos recifes de Abrolhos, ao norte. O fitoplâncton e o bacterioplâncton são comunidades chave para o entendimento da dinâmica da biodiversidade nos ecossistemas marinhos, já que estas são as principais responsáveis pela base energética das cadeias tróficas e elementos chave na ciclagem de nutrientes (KIRCHMAN, 2008). Para um monitoramento eficiente, é necessário a análise quali-quantitativa dessas comunidades e de sua biomassa nas diferentes frações de tamanho (do pico- ao microplâncton) e em diferentes escalas espaço-temporais. Neste sentido, o tema combinará técnicas de microscopia, citometria de fluxo, fluorimetria, espectrofluorimetria e sequenciamento gênico para a determinação da diversidade, fisiologia, abundância e biomassa destas comunidades, além de técnicas de estatística multivariadas para a busca de padrões e de indicadores da qualidade ambiental. Os dados brutos serão entregues mensalmente, conforme as amostras forem sendo analisadas e os dados processados, e as análises dos dados, conforme cronograma de entrega de relatórios.

3. OBJETIVO

Monitorar a dinâmica espaço-temporal (de estrutura, composição, fisiologia e biomassa) das comunidades marinhas do fito- e bacterioplâncton da bacia do Espírito Santo e do Banco de Abrolhos e região estuarina do Rio Doce afetada pelo aporte de rejeito de mineração do rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG) frente às variações ambientais, fornecendo subsídios para a análise integrada do PMBA.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Análise quantitativa do fitoplâncton e bacterioplâncton

Avaliar a abundância numérica do fitoplâncton e do bacterioplâncton e a biomassa clorofiliana por meio de técnicas de microscopia, citometria de fluxo e espectrofluorimetria. As amostras coletadas em cada campanha trimestral serão analisadas até o momento da finalização da campanha seguinte. A abundância dessas comunidades é comumente utilizada na identificação de alterações ambientais, uma vez que respondem rapidamente às mudanças no meio, como por exemplo mudanças nas concentrações de nutrientes e salinidade (LI E DICKIE, 2001). Ainda, o aumento excessivo da abundância de algumas espécies fitoplanctônicas podem levar a eventos de floração, com impacto nas cadeias tróficas e processos biogeoquímicos (ESTEVES, 2011).

META 2 – Análise qualitativa do fitoplâncton

Avaliar a composição da comunidade fitoplanctônica por meio da descrição taxonômica, morfológica e caracterização citométrica. Complementarmente, em amostras selecionadas *a posteriori*, serão aplicadas técnicas moleculares para refinamento e/ou auxílio na identificação de alguns táxons. As amostras coletadas em cada campanha trimestral serão analisadas até o momento da finalização da campanha seguinte. A análise qualitativa do fitoplâncton é importante em programas de monitoramento nos quais os objetivos contemplem a biodiversidade, uma vez que é necessário conhecer quais são os táxons presentes na região de estudo. A riqueza de táxons da região, indicador de nível básico de biodiversidade (MAGURRAN e MCGILL, 2011), é definida a partir da análise taxonômica dos grupos registrados. Ainda, é necessário definir quais táxons estão presentes para auxiliar na sua identificação durante a análise quantitativa.

META 3 - Análise do estado fisiológico do fitoplâncton

Avaliar o estado fisiológico do fitoplâncton no momento da coleta por meio de sua clorofila ativa. As

amostras coletadas em cada campanha trimestral serão analisadas até o momento da finalização da campanha seguinte. A clorofila ativa (discriminada em clorofilas a, b, c1+c2 e divinilclorofila a) reflete o estado fisiológico do fitoplâncton, pois é calculada como uma razão das clorofilas em relação ao total de clorofilas mais seus respectivos feopigmentos, dado em porcentagem. Como o feopigmento é o subproduto da degradação das clorofilas, quanto maior a proporção de feopigmentos em relação a clorofila (menor clorofila ativa), maior é quantidade de células mortas e/ou metabolicamente danificadas (KIRK, 1994; REYNOLDS, 2006). Mudanças ambientais que afetem negativamente a comunidade fitoplanctônica podem, portanto, influenciar a porcentagem de clorofila ativa.

META 4 - Avaliação dos padrões ambientais que influenciam as comunidades do fito- e bacterioplâncton

Determinar padrões e variáveis ambientais que influenciam a dinâmica espaço-temporal das comunidades do fito- e bacterioplâncton. Os resultados gerados ao longo do monitoramento serão analisados de forma integrada com variáveis ambientais geradas por este grupo e em outros grupos e serão apresentados e discutidos em relatórios comuns ao PMBA. Os padrões gerados serão importantes no entendimento da dinâmica das comunidades estudadas frente às mudanças ambientais operando em diferentes escalas temporais na região marinha adjacente ao Rio Doce afetada pelo rejeito de mineração. Ainda, considerando os objetivos de integração dos dados no PMBA, esta etapa do projeto é importante para gerar um conjunto de resultados com menor dimensão e maior capacidade explicativa, facilitando o processo de análise integrada.

META 5 - Seleção de indicadores para a análise integrada do PMBA

Avaliar e selecionar indicadores das comunidades do fito- e bacterioplâncton relacionados com os principais padrões da dinâmica espaço-temporal dessas comunidades e com forçantes ambientais importantes para a explicação dessas dinâmicas e/ou que estejam relacionadas com o aporte de rejeito de mineração no ambiente marinho. Os resultados gerados ao longo do monitoramento serão analisados de forma integrada com variáveis ambientais geradas neste e em outros grupos e serão apresentados e discutidos em relatórios comuns ao PMBA. Esses indicadores são produtos com relevante interesse para a análise integrativa do PMBA.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Densidade numérica total do fitoplâncton (nano- e microfitoplâncton) - Composição quantitativa (por Tamanho e Classes) - Composição qualitativa (Riqueza e Lista taxonômica) - Índices de diversidade e equitabilidade - Eficiência Fotossintética (Quantum Yield) - Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA) - Fração Incidente de luz (%RFA) - Coeficiente de atenuação (Kd RFA)	Stéfano Zorzal de Almeida
- Densidade numérica total do picofitoplâncton - Densidade numérica total do bacterioplâncton - Composição quantitativa do picofitoplâncton (<i>Prochlorococcus</i> e <i>Synechococcus</i>) - Composição qualitativa do fitoplâncton e bacterioplâncton (diversidade genética) - Diversidade citométrica do fitoplâncton - Biomassa clorofiliana - Clorofila ativa	Paulo Sergio Salomon

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Análise espaço-temporal da estrutura e composição do pico, nano e microfitoplâncton e bacterioplâncton na foz do Rio Doce e regiões adjacentes. - Integração por meio de técnicas multivariadas da variação temporal e espacial da estrutura e biomassa fito- e bacterioplanctônica com variáveis ambientais selecionadas. - Avaliação e seleção das variáveis brutas ou derivadas destas que permitam a identificação de alterações ambientais para subsídio da análise integrada do PMBA.	Stéfano Zorzal de Almeida Paulo Sérgio Salomon

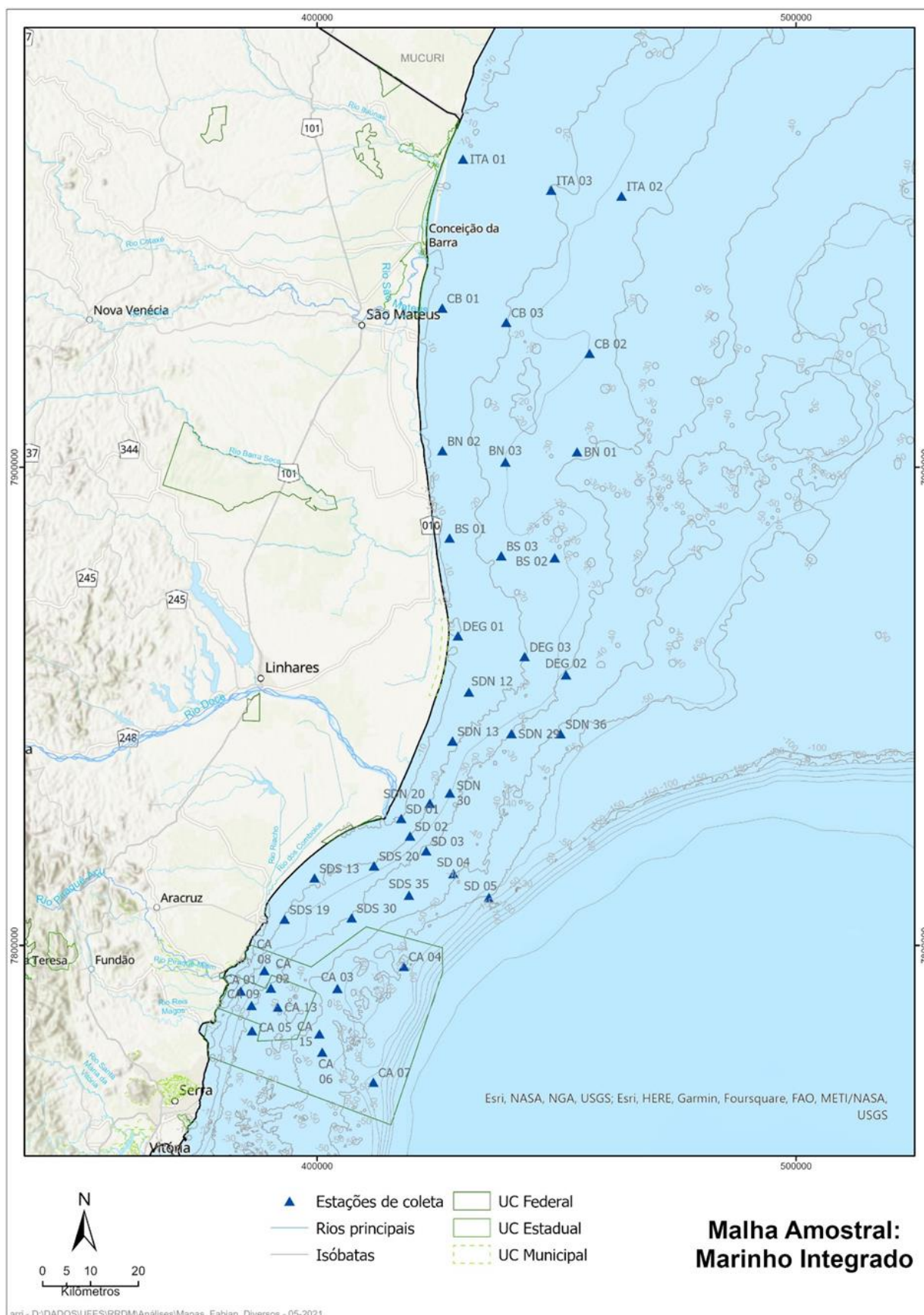
6. METODOLOGIA

As amostras do fitoplâncton e do bacterioplâncton na área de estudo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental (PMBA) serão coletadas em superfície (qualitativa, quantitativa e biomassa) e próximo do fundo (quantitativa e biomassa) conjuntamente com as amostragens para determinação das variáveis físico-químicas.

6.1. Malha e frequência amostral

Serão realizadas campanhas trimestrais em 42 estações amostrais em toda a malha (Figura 7 – triângulos azuis) e, adicionalmente, até quatro campanhas emergenciais em 16 estações amostrais próximo à foz do Rio Doce (estações com códigos SDS, SD, SDN). Ainda, serão realizadas campanhas semestrais para coletas em até 10 estações amostrais na região de Abrolhos, conjuntamente com a campanha do eixo temático Fundos Recifais e Bancos de Rodolitos.

Figura 7: Mapa com localização das estações de monitoramento do Ambiente Marinho que contemplam as coletas do tema Fitoplâncton.



6.2. Análise qualitativa do fitoplâncton (Meta 2)

As amostras para **análise qualitativa** da fração $>60\mu\text{m}$ do fitoplâncton serão coletadas através de arrastos verticais com o uso de rede de plâncton com malha de $60\mu\text{m}$ de abertura, à baixa velocidade, na superfície das estações amostrais e fixadas com solução formalina entre 2-4%. Para análises da fração do picofitoplâncton por citometria de fluxo e da comunidade total do fitoplâncton por sequenciamento gênico serão realizadas amostragens com o uso de garrafa oceanográfica. Para análises por citometria de fluxo as amostras serão fixadas em glutaraldeído 0,5% por 15min. a temperatura ambiente, e imediatamente congeladas em N-líquido até a análise. Para o sequenciamento gênico serão filtrados volumes entre 100 e 500mL de amostras em filtros de polycarbonato de $0,2\mu\text{m}$ de porosidade. Os filtros serão congelados em N-líquido até processamento em laboratório.

Para as análises em laboratório das amostras de rede de $60\mu\text{m}$ serão utilizados microscópios biológicos ópticos, equipados com câmera fotográfica para registros de imagens e ocular com retículo de medição calibrado. Os organismos serão registrados, analisando-se as suas características morfológicas e morfométricas, e identificados, por meio de bibliografia especializada clássica (e.g. TOMAS, 1997; SOURNIA, 1986; CHRÉTIENNOT-DINET, 1990) e recentes. Os nomes científicos dos táxons registrados nas amostras serão padronizados por meio do banco de dados internacional Algaebase (<http://www.algaebase.org/>).

A análise qualitativa da fração de tamanho de organismos relativamente maiores obtida na rede ($>60\mu\text{m}$) e das frações menores, obtidas com garrafa, até a fração do picoplâncton (0,2 a $2\mu\text{m}$), será feita através (i) da citometria de fluxo multiparamétrica (ver abaixo) que caracteriza, principalmente, picocianobactérias dos gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus* pelos sinais de espalhamento de luz e fluorescência (MARIE et al. 2014) e (ii) por sequenciamento gênico.

O sequenciamento gênico será utilizado em duas abordagens: (i) para acessar a diversidade taxonômica da comunidade fitoplanctônica em amostras selecionadas da malha amostral, pela técnica de *metabarcoding* com sequenciamento de alto rendimento (NGS) e (ii) para resolver a identificação de táxons crípticos que sejam difíceis de caracterizar morfológicamente, de qualquer fração de tamanho, através de sequenciamento tradicional Sanger. Esta segunda abordagem irá subsidiar as análises de taxonomia clássica de parte do nano- e do microfitoplâncton.

A técnica de metabarcoding será aplicada através da amplificação de regiões dos genes ribossomais 16S rDNA (16S-V4, PARADA et al. 2016) e 18S rDNA (18S-V8V9, DE VARGAS et al. 2015) para a caracterização taxonômica das comunidades do bacterioplâncton e fitoplâncton, respectivamente. Vale ressaltar que cianobactérias, procariontes que compõe o grupo funcional fitoplâncton, são detectadas e caracterizadas junto ao bacterioplâncton. As reações de sequenciamento serão feitas por empresa especializada utilizando técnicas de sequenciamento de alto rendimento (Next Generation Sequencing, NGS, plataforma Illumina), com a geração de 50.000 a 100.000 sequências/amostra. Esta cobertura permitirá uma caracterização abrangente das comunidades planctônicas estudadas (CARPORASO et al. 2012). A remoção de artefatos de sequenciamento será realizada com o software DADA2 (CALLAHAN et al. 2016) e a identificação taxonômica das sequências obtidas será realizada por

análises de consenso de similaridade com os bancos de dados Silva 132 (QUAST et al. 2012) e PhytoRef/PR2 (DECELLE et al. 2015).

O sequenciamento de Sanger será usado para identificação no nível de espécie de organismos de interesse ecológico (ex. alta abundância observada em amostras de interesse, potenciais indicadores de impacto, organismos mantidos em cultivo) e de difícil classificação morfológica (crípticas e/ou de pequeno tamanho). Essa identificação será realizada através do sequenciamento completo dos genes ribossomais 16S rDNA, para cianobactérias (SALOMON et al. 2003) e 18S rDNA, para eucariotos (KLOPPER et al. 2013). A classificação taxonômica será realizada a partir de reconstrução filogenética, comparando as sequências obtidas com sequências de linhagens conhecidas disponíveis no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

6.3. Análise quantitativa do fitoplâncton e bacterioplâncton (Meta 1)

As amostragens quantitativas dos componentes do fitoplâncton e bacterioplâncton serão realizadas com o uso de garrafa oceanográfica e fixadas, para análises do fitoplâncton por microscopia, com solução formalina (2-4%) neutralizada com hexametilenotetramina. Para análises do pico (auto e heterotrófico) por citometria de fluxo as amostras serão fixadas em glutaraldeído 0,5% por 15min. a temperatura ambiente e imediatamente congeladas em N-líquido até a análise. A contagem do fitoplâncton (fração nano- e microfitoplâncton) será realizada utilizando-se câmara de sedimentação de Utermöhl (UTERMÖHL, 1958) em microscópio invertido, após um tempo mínimo de 24 horas de sedimentação conforme Lund, Kipling e Le Cren (1958). Os resultados serão expressos em organismos por mL e convertidos em organismos por litros (abundância ou densidade de organismos), conforme Equação 1:

$$N = n \times A \times 1 V \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

N = Número de organismos por ml

n = número de organismos contados

a = Área contada

A = Área total da câmara

V = Volume total sedimentado

Durante a análise quantitativa em microscópio invertido, o fitoplâncton será classificado em duas **frações de tamanho** durante a quantificação: nanofitoplâncton (2 a 20 µm) e microfitoplâncton (maior que 20 µm).

As frações do picofitoplâncton serão analisadas quali- e quantitativamente por citometria de fluxo multiparamétrica em um citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter) equipado com lasers violeta

(405nm), azul (488nm) e vermelho (628nm). Antes das análises, as amostras armazenadas em N-líquido serão descongeladas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A fração autotrófica (cianobactérias e eucariotos unicelulares clorofilados) será analisada de acordo com DUBELAR & JONKER (2000) e MARIE et al. (2014). O limiar de detecção (*threshold*) será aplicado ao sinal de fluorescência vermelha emitida pela clorofila (canal FL3-H). Amostras serão aspiradas a uma velocidade entre 50 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 1 a 5 min. Serão coletados sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H), de fluorescência da clorofila, e dos pigmentos acessórios ficoeritrina e ficocianina, nos sensores correspondentes aos picos de emissão destes pigmentos.

A fração heterotrófica do pico- e nanoplâncton (bactérias e protistas unicelulares) será analisada por citometria de fluxo, de acordo com MARIE et al. (1997). Alíquotas de 180 μL de cada amostra serão coradas com fluorocromo para ácidos nucleicos *SYBR-Green I* (Thermo Scientific, S-7567). Esferas fluorescentes de poliestireno de 1 μm serão adicionadas como controle interno. As amostras serão incubadas a temperatura ambiente por 15 min. antes da citometria de fluxo, a uma velocidade entre 20 e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, por 1 a 2 min. O *threshold* será aplicado ao sinal de fluorescência verde emitida pelo fluorocromo (canal FL1-H). Serão coletados os sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H) e os sinais de fluorescência do SYBR Green I e pigmentos fotossintéticos.

Para o processamento dos dados citométricos tanto do fito- quanto do bacterioplâncton, os arquivos gerados pelo citômetro, no formato FCS, serão analisados inicialmente no software nativo do equipamento (Cytoflex) e, em seguida, no programa *FlowJo* (FlowJo, LLC), visando a delimitação de populações alvo e cálculos de concentração de células.

6.4. Índices de diversidade (Meta 4 e Meta 5)

Os índices de diversidade específica (Índice de Shannon-Weaver) serão calculados a partir dos valores de densidade numérica do fitoplâncton, conforme o método proposto por SHANNON e WEAVER (1963). Tal índice fornece uma medida do grau médio de incerteza em prever que espécies e indivíduos serão escolhidos aleatoriamente de um total de S espécies e N indivíduos (DAJOZ, 1973). MARGALEF (1976) ressalta que em comunidades naturais, os valores numéricos do índice de diversidade de Shannon-Weaver raramente excedem em cinco. Ademais, a diversidade em comunidades fitoplanctônicas está normalmente entre 1 e 2,5 em águas costeiras e entre 3,5 e 4,5 em águas oceânicas. A equabilidade dos táxons será obtida através da expressão de PIELOU (1977; 1966), cujos valores variam entre 0, uma comunidade totalmente desbalanceada (proporção de indivíduos por espécie), e 1, quando todos os táxons possuem o mesmo número de indivíduos.

Serão também estimados índices de diversidade com os atributos citométricos da comunidade fitoplanctônica, seguindo proposição de LI (1997). Os dados citométricos serão processados no software *FlowJo* para remoção de partículas detriticas, ruído eletrônico e a população de esferas de controle interno. As estimativas de diversidade utilizarão os arquivos FCS previamente tratados, seguindo a rotina de agrupamento de PROPS et al. (2016) no ambiente R. Os parâmetros de interesse para as análises de diversidade citométrica serão: espalhamento de luz frontal e lateral (FSC-H e SSC-

H) e os sinais de fluorescência dos pigmentos naturais das células (clorofila, ficoeritrina e ficocianina). Índices de diversidade e equabilidade serão calculados com os atributos citométricos de forma análoga à descrita acima para os índices de diversidade específica (HILL, 1973).

6.5. Biomassa clorofiliana e clorofila ativa (Meta 3)

A análise quali e quantitativa de pigmentos clorofilianos na água será feita através de extração em acetona e detecção por espectrofluorimetria, usando os protocolos de extração e análises descritos a seguir.

A coleta para análises de clorofila será feita com garrafa oceanográfica. Volumes de 250 a 500mL serão filtrados em filtros de fibra de vidro (Whatman, GF/F). Os filtros serão imediatamente armazenados em criotubos devidamente rotulados e congelados ao abrigo da luz em N-líquido. No laboratório os filtros serão mantidos em N-líquido ou em ultrafreezer (-60 °C) até a análise.

Para extração dos pigmentos clorofilianos, os filtros GF/F com material coletado em campo serão transferidos dos tubos criogênicos de armazenagem para tubos de vidro com 6mL de acetona a 90%. macerados com bastão de vidro. Em seguida, os filtros serão macerados com bastão de vidro e os tubos com extratos acetônicos serão selados com *Parafilm* e mantidos a 4°C ao abrigo da luz por 12 h, sendo subsequentemente centrifugados por 10 min. a 2500 rpm e as fluorescências dos extratos serão medidas em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) onde será feita a aquisição de 31 espectros de emissão de fluorescência entre comprimentos de onda de 615 e 715nm, com resolução de 2nm e excitação entre 390-480 nm com resolução de 3nm, para cada amostra. As concentrações de clorofilas (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c*₁+*c*₂, divinil-clorofila *a*) e feofitinas serão calculadas segundo o método de NEVEUX & LANTOINE (1993) modificado por VANZAN et al. (2015).

6.6. Eficiência fotossintética e radiação fotossinteticamente ativa (Meta 4 e Meta 5)

Além da coleta de amostras para análise das comunidades do fito- e bacterioplâncton será realizada a estimativa de eficiência fotossintética (diferença entre fluorescência máxima e mínima – F_v/F_m), obtidas através do fluorímetro *Aquaflash*, e a mensuração da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), utilizando-se um hidrorradiômetro (LiCor), acoplado a uma gaiola junto com a sonda YSI EXO 2, realizando perfilagens conjuntas e capturando dados na mesma frequência (1Hz). Através dos dados de RFA obtidos pelo hidrorradiômetro e os dados de profundidade obtidos pela Sonda YSI EXO 2, serão calculados perfis de RFA, fração de radiação incidente (%) para cada profundidade de coleta, e o coeficiente vertical de atenuação da luz – K_d (KIRK, 1986), através das fórmulas abaixo:

$$(\%) \text{ radiação incidente} = \frac{(RFA_1 \cdot 100)}{RFA_0} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

RFA_1 é a RFA aferida a determinada profundidade;

RFA_0 é a RFA aferida em subsuperfície (assim que o equipamento é imerso na água);

$$Kd(RFA) = \frac{\ln(I_0) - \ln(I_1)}{z} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: I_0 é a RFA aferida na subsuperfície;

Z_1 é a RFA aferida na profundidade para a qual se deseja calcular o $Kd(RFA)$;

e z é a profundidade em metros (m) para a qual se deseja calcular o $Kd(RFA)$.

6.7. Análise numérica (Meta 4 e Meta 5)

Os dados serão analisados utilizando análises univariadas (e.g. ANOVA), respeitando o pressuposto de cada uma, para averiguar a diferença da média de variáveis em diferentes agrupamentos, como a setorização das estações amostrais e agrupamentos quanto a sazonalidade. Ainda, serão utilizadas análises de agrupamento para avaliar se os agrupamentos prévios supracitados são convenientes para a comunidade fitoplanctônica e do bacterioplâncton. Por último análises multivariadas (e.g. PCA - Análise de Componentes Principais, RDA - Análise de Redundância, Partição da Variância), serão utilizadas para reduzir a dimensionalidade dos dados e buscar padrões espaciais e temporais de distribuição de espécies e variação da comunidade fitoplanctônica (LEGENDRE & LEGENDRE, 2012), relacionando com dados provenientes de outros eixos temáticos. Todas as análises serão realizadas no Programa R (R CORE TEAM, 2020) e pacotes específicos para análise de comunidades, como o vegan (OKSANEN et al., 2020).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; ROSEN, M.J.; HAN, A.W.; JOHNSON, A.J.A.; HOLMES, S.P., DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), pp.581, 2016.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N., OWENS, S.M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), pp.1621-1624, 2012

CHRÉTIENNOT-DINET, M.J. Atlas du phytoplancton marin. Volume III: Chlorarachnophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglénophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées et Tribophycées Avec la collaboration de Chantal Billard et Alain Sournia. pp. [1]-261. Paris: Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique 15, quai Anatole France - 75700 Paris. 1990.

DAJOZ, R. Ecologia Geral. São Paulo, **Vozes**. 472p.,1973.

DE VARGAS, C.; AUDIC, S.; HENRY, N.; DECELLE, J.; MAHÉ, F.; LOGARES, R.; LARA, E.; BERNEY, C.; LE BESCOT, N.; PROBERT, I.; CARMICHAEL, M. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237), p.1261605.-583, 2015.

DECELLE, J.; ROMAC, S.; STERN, R.F.; BENDIF, E.M.; ZINGONE, A.; AUDIC, S.; GUIRY, M.D.; GUILLOU, L.; TESSIER, D.; LE GALL, F.; GOURVIL, P. Phyto REF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular ecology resources*, 15(6), pp.1435-1445, 2015.

DUBELAAR, G.B.J.; JONKER, R.R. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* v. 64, p. 135-156, 2000.

ESTEVES, F.A. 2011. **Fundamentos de Limnologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Interciência.

HILL, M.O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54 (2): 427-432. 1973.

KIRCHMAN, D. L. *Microbial Ecology of the Oceans*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 593p. 2008.

KIRK, J. T. O. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. **Cambridge University Press**, 401p. 1986.

KIRK, J.T.O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. 2nd. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 528.

KLÖPPER, S.; JOHN, U.; ZINGONE, A.; MANGONI, O.; KOOISTRA, W.H.C.; CAMBELLA, A. Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*? *Eur. J. Phycol.* 48, 79–92, 2013

LEGENDRE, P. ; LEGENDRE, L. *Numerical Ecology*. 3ed. Amsterdam : Elsevier, 2012.

LI, W.K.W. Cytometric diversity in marine ultraphytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 42(5): 874-880. 1997.

LI, W.K.W.; DICKIE, P.M. 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by Flow Cytometry. **Cytometry**, n. 44, p.236-246.

LUND J. W. G.; KIPLING, C. R., LENCREN, E.D. The inverted microscope method of estimating alga number and statistical basis of estimating by counting. **Hydrobiologia**, v.11, p. 143- 170, 1958.

MAGURRAN, A.E.; MCGILL, B.J. 2011. **Biological diversity: Frontiers in measurement and assessment**. Oxford: Oxford University Press.

MARGALEF, R. Diversity. In: SOURNIA, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle. **UNESCO**, 1976.

MARIE D., RIGAUT-JALABERT F., VAULOT, D. An improved protocol for flow cytometry analysis of

phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry*, v. 85, p. 962–968, 2014.

NEVEUX, J.; LANTOINE, F. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea Res. I*, v. 40, p. 1747-1765, 1993.

OKSANEN J., F. G. BLANCHET, R. KINDT, P. LEGENDRE, P. R. MINCHIN, R. B. O'HARA, G. L. SIMPSON, P. SOLYMOS, M. H. H. STEVENS, E. SZOECS; H. WAGNER, 2020. Package 'vegan'. R package version 2.5-7. <http://cran.rproject.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>.

PARADA, A.E.; NEEDHAM, D.M.; FUHRMAN, J.A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), pp.1403-1414, 2016

PIELOU, E. C. *Mathematical ecology*. **New York: Wiley**. 1977.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, v.13, p.131-144, 1966.

PROPS R. et al. Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. *Methods Ecol. Evol.* v. 7, p. 1376-1385, 2016.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), pp.D590-D596., 2012

R CORE TEAM, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>.

REYNOLDS, C.S. 2006. **Ecology of phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 535p.

SALOMON, P.S.; JANSON, S.; GRANÉLI, E. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae*, 2(4), pp.261-272., 2003.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Illinois. **University Press. Urbana**, 1963.

SOURNIA, A. 1986. Atlas du phytoplankton marin. Volume I: Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidiophycées. Éditions du Centre National de La Recherche Scientifique, Paris. 1986.

TOMAS, C.R. *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego: Academic Press, 1997.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton – methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, v.9, p. 1–38. 1958.

VANZAN M. et al. Picoplankton and nanoplankton variability in an Antarctic shallow coastal zone (Admiralty Bay) during the austral summer of 2010/2011. *Polar Biol.* v.38, p. 1-18, 2015. ARIF, C. et al.

Assessing Symbiodinium diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. Mol. Ecol. v. 23, p. 4418-4433, 2014.

ZOOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Luiz Fernando Loureiro Fernandes	Coordenador	UFES
Sergio Luiz Costa Bonecker	Pesquisador	UFRJ
Vitor de Oliveira Conceição	Estagiário	UFES
Iniciação Científica a definir	Estagiário	UFES
Gustavo Martins Rocha	Pesquisador	UFES
Bianca Salvador	Pesquisador/Campo	UFES
Gabriel Harley Costa Santos	Pesquisador/Campo	UFES
Priscila Teixeira Amaral	Pesquisador/Campo	UFES
Claudeilton Severino de Santana	Pesquisador/Campo	UFES
Profissional Pleno II a definir	Pesquisador	UFES
Luciano Alberto Elia Junior	Apoio técnico	UFES
Cristiane Scarton Gomes	Apoio técnico	UFES

2. ESCOPO

Avaliação evolutiva das consequências do aporte do rejeito de mineração na comunidade zooplânctônica, visto o impacto causado nos momentos de maior e menor vazão do Rio Doce, fato este constatado através dos indicadores que mostraram maior fragilidade ecológica da comunidade em momentos de maior vazão do rio.

3. OBJETIVO

Analisar quali-quantitativamente o zooplâncton na região de amostragem verificando as possíveis alterações na composição, biomassa, abundância e diversidade, bem como seus indicadores ambientais, ao longo do tempo.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Triagem

Análise da Biomassa;

Triagem do material coletado em grandes grupos para posterior identificação.

META 2 – Identificação

Identificação dos organismos zooplanctônicos, análise das comunidades e definição de indicadores.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Biomassa - Abundância - Composição	Luiz Fernando Loureiro Fernandes

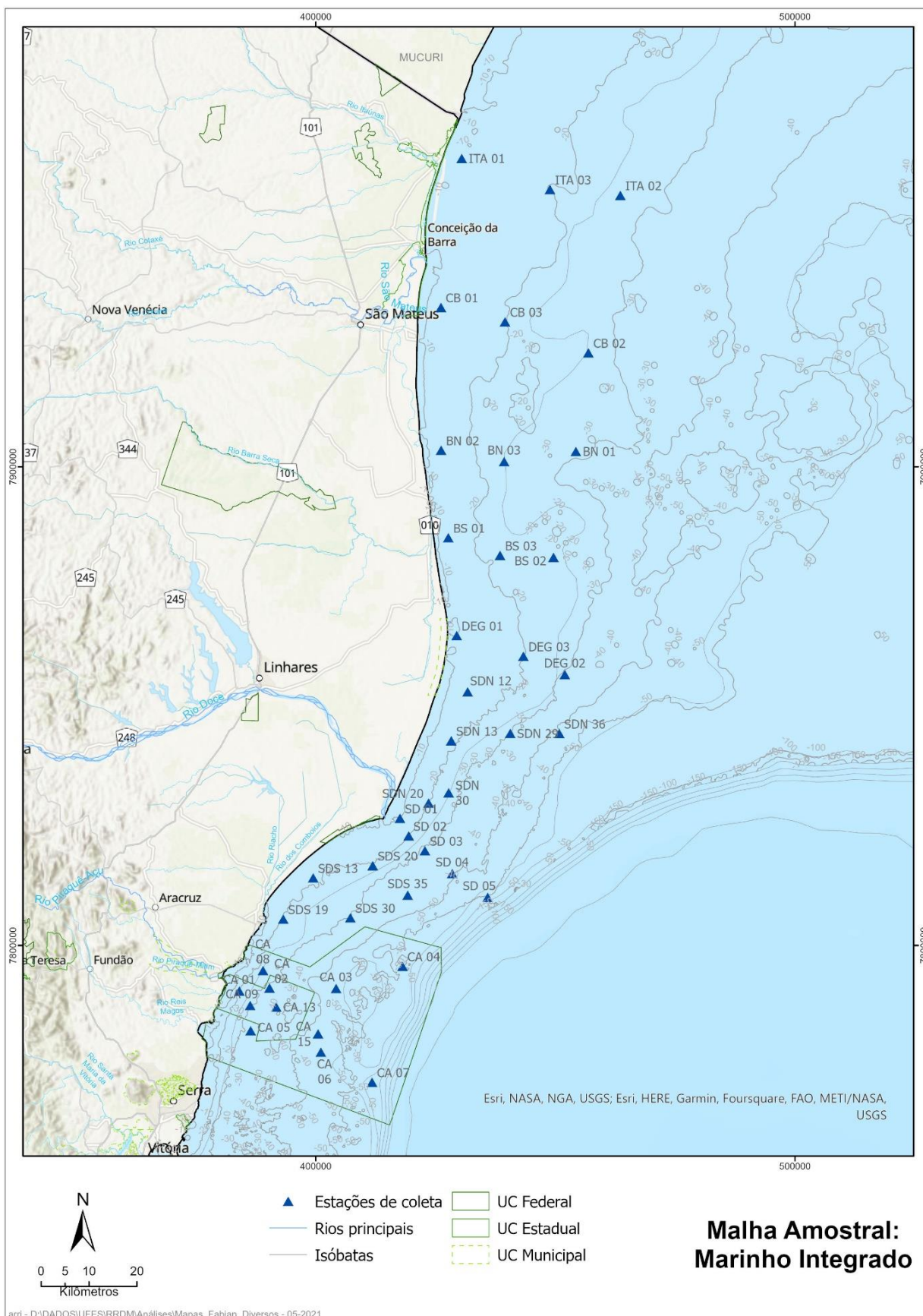
5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Análise espaço-temporal da variação da comunidade zooplanctônica na foz do Rio Doce e regiões adjacentes (trimestralmente). - Discussão da variação da estrutura da comunidade zooplanctônica ao longo do tempo, correlação com os parâmetros ambientais e proposição de indicadores.	Luiz Fernando Loureiro Fernandes

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

Foram propostas coletas em 42 pontos amostrais distribuídos desde Itaúnas, no norte do Espírito Santo, até a região da Apa Costa das Algas. (Figura 8). As coletas serão realizadas trimestralmente dentro da malha proposta.

Figura 8: Mapa amostral contendo os pontos de coleta do monitoramento marinho do zooplâncton (triângulos azuis).



6.2. METAS 1 e 2 – Amostragem, triagem e Identificação

Para cada ponto amostral serão realizados arrastos verticais de zooplâncton com rede tipo WP-2 de fechamento com malha de 200 micrômetros, contendo um fluxômetro mecânico na abertura da boca da rede. Em profundidades superiores a 5 metros e inferiores a 30 metros, deverão ser feitas coletas verticais desde o fundo até metade da profundidade, e da metade da profundidade até a superfície para evitar perdas devido à migração dos organismos. Em profundidades maiores de 30 metros, as coletas deverão ser feitas do fundo até 30 metros, e depois seguindo o padrão anterior. As coletas de zooplâncton deverão ser feitas no período noturno para minimizar o impacto da migração vertical dos organismos.

O material coletado deverá ser preservado em formalina 4% tamponada com tetraborato de sódio. Cada amostra deverá ser colocada em frasco de polietileno de 500mL devidamente rotulado. O fixador deve ser colocado antes da amostra. Após colocar a amostra no frasco com fixador, completar o volume até cerca de 400 mL com a água do mar que for utilizada para retirar a amostra do copo da rede.

As amostras serão fracionadas de acordo com a densidade de organismos nas amostras. Para a obtenção de subamostras será utilizado o partidor Folsom Plankton Sample Splitter (Hidrobios®), sendo o número de divisões (1/2, 1/4, 1/8... até 1/1024) feito de modo a garantir a presença de pelo menos 500 espécimes na alíquota. Em contraposição, as amostras de pequeno volume serão contadas em sua totalidade.

As subamostras obtidas serão analisadas sob microscópio estereoscópico (Nikon SMZ800) utilizando câmaras de Bogorov para separação em grandes grupos taxonômicos.

Sequencialmente será feita a identificação dos componentes do zooplâncton ao menor nível taxonômico possível, utilizando bibliografia especializada (e.g. BOLTOVSKOY, 1999; BONECKER, 2006; entre outros) e, quando necessário, microscópio óptico Nikon Eclipse 50i será utilizado para identificação de partes específicas dos organismos para auxiliar nesta identificação. A nomenclatura dos táxons será checada junto ao banco de dados internacional ITIS – Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.gov>) para verificação da validade do nome. Após a identificação todos os organismos serão tombados na coleção do Laboratório de Zooplâncton da Universidade Federal do Espírito Santo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLTOVSKOY, D. (ED.). **South Atlantic Zooplankton**. Backhuys Publishers, Leiden. 1999.

BONECKER, S.L.C. **Atlas de Zooplâncton da Região Central da Zona Econômica Exclusiva Brasileira**. Séries Livros No. 21. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 2006.

ICTIOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Ana Cristina Teixeira Bonecker	Coordenador	UFRJ
Márcia Salustiano de Castro	Pesquisador	UFRJ
Cristina de Oliveira Dias	Pesquisador	UFRJ
Ana Carolina Fontoura Valente	Pesquisador	UFRJ
Fabiana Teixeira Bonecker	Pesquisador	UFRJ
Luiz Manoel Cosenza	Pesquisador	UFRJ
Marta Cristiane de Carvalho Quintas	Técnico	UFRJ
Rafael Oliveira de França	Pesquisador	UFRJ

2. ESCOPO

Indicadores ecológicos baseados em comunidades ictioplanctônicas têm sido reconhecidos como importante ferramenta para avaliar os impactos antrópicos (SANTOS et al., 2017). Geralmente quando uma comunidade sofre um aumento de estresse antropogênico, desencadeia uma diminuição do número e abundância de espécies com habitat específicos. Há diminuição de espécies de peixes com maior sensibilidade e baixa tolerância, enquanto as espécies generalistas tendem a aumentar a dominância, resultando em uma estrutura de comunidade simplificada (FONSECA et al., 2013). Na verdade, as larvas de peixes mostram uma alta vulnerabilidade a mudanças ambientais (STRYDOM, 2015; SANTOS et al., 2017), destacando sua importância como indicadores de poluição (WESTERNHAGEN et al., 2001).

A exposição desses organismos a poluentes tais como metais, pode influenciar na sua sobrevivência (KHOSHNOOD, 2017). Sendo assim, estudos sobre o ictioplancton podem indicar como está a saúde do ecossistema uma vez que esses organismos refletem as mudanças ambientais (<https://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=FRD&id=6210>).

3. OBJETIVO

O objetivo geral do projeto é monitorar quali-quantitativamente a variação espacial e temporal da comunidade ictioplanctônica sob a influência do rejeito oriundo do rompimento da barragem de Mariana na foz do rio Doce e região costeira adjacente. Verificar também o efeito da vazão do Rio Doce, bem como eventos meteoceanográficos na ocorrência e distribuição de ovos viáveis e não viáveis e larvas de peixes com deformidades. Além disso, analisar a influência dos fatores ambientais na abundância e riqueza do ictioplancton na área afetada pelo rejeito.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Avaliação da densidade de ovos e larvas de peixes

Estudos sobre densidade de ovos e larvas de peixes são importantes para o conhecimento das estratégias de reprodução e das épocas de desova. Grande parte dos peixes ósseos marinhos possui uma fase de larva planctônica e é um período crítico no ciclo de vida desses organismos. As variações que ocorrem nesse estágio de desenvolvimento interferem no recrutamento e nos estoques das populações adultas.

META 2 – Relação de ovos viáveis e não viáveis

Após a desova há uma mortalidade natural dos ovos de peixes que varia entre as espécies e pode ser causada, entre vários fatores, por predação, condições abióticas desfavoráveis ou poluição entre outros. Na ontogenia dos peixes, a sensibilidade aos metais geralmente diminui com a idade e os ovos e as larvas são considerados mais suscetíveis. Os efeitos adversos dos metais sobre os ovos de peixes afetam a taxa de eclosão. Esta diminuição na eclosão vai afetar diretamente os estoques pesqueiros da região.

META 3 – Identificação da comunidade ictioplanctônica e interação entre dados abióticos e bióticos

A ocorrência e a distribuição das larvas de peixes são reflexos do padrão de desova dos adultos assim como do comportamento da larva no ambiente, uma vez que as mesmas sofrem influência dos parâmetros ambientais. A identificação das larvas a níveis taxonômicos inferiores auxilia no reconhecimento do estoque, além de acompanhar a curva acumulativa de espécies. Esta curva mostra se já foram encontradas todas as espécies que já haviam sido registradas na área. Outra observação importante é se está havendo substituição de espécies. As densidades podem se manter, mas a diversidade diminui devido a espécies r-estrategistas, ou seja, possuem a capacidade de explorar ao máximo um ambiente, têm ciclo de vida curto e alta capacidade reprodutiva, ocupando nichos de outras espécies. Podendo ocorrer assim uma diminuição da biodiversidade.

META 4 – Acompanhamento das larvas com deformidades devido a exposição ao rejeito

Durante a identificação das larvas de peixes é feita a verificação se há alguma alteração morfológica visível em cada organismo coletado. Larvas com trato digestório degenerados ou mesmo com sedimento alaranjado têm sido observadas desde a chegada do rejeito oriundo do rompimento da barragem. Segundo a literatura a toxicidade dos metais é mais acentuada nos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes e levam a um retardo no desenvolvimento, deformidades morfológicas e

funcionais ou até mesmo a morte. As deformidades do corpo larval podem ser usadas como bioindicador da poluição da água com metais pesados.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
Meta 1 - Triagem dos ovos e larvas de peixes; - Número bruto dos ovos e larvas de peixes; - Cálculo da densidade de ovos e larvas de peixes.	Rafael França Marta Quintas Luiz Cosenza Fabiana Bonecker
Meta 2 - Medição dos ovos de peixes; - Reconhecimento da fase de desenvolvimento dos ovos; - Separação em ovos viáveis e não viáveis; - Cálculo do percentual e análise estatística.	Ana Carolina Valente Luiz Cosenza Cristina Dias Márcia Castro Ana Bonecker
Meta 3 - Identificação dos ovos de peixes; - Medição das larvas de peixes; - Separação nos diferentes estádios de desenvolvimento; - Identificação das larvas de peixes; - Curva acumulativa de espécies; - Análise estatística.	Cristina Dias Marta Quintas Fabiana Bonecker Rafael França Ana Carolina F. Valente Márcia Castro Ana Bonecker
Meta 4 - Identificar e diferenciar as larvas de peixes com deformidades; - Fotografar as larvas e comparar com as existentes na coleção do laboratório e na literatura; - Plotar as larvas em mapas de distribuição.	Cristina Dias Fabiana Bonecker Márcia Castro Ana Bonecker

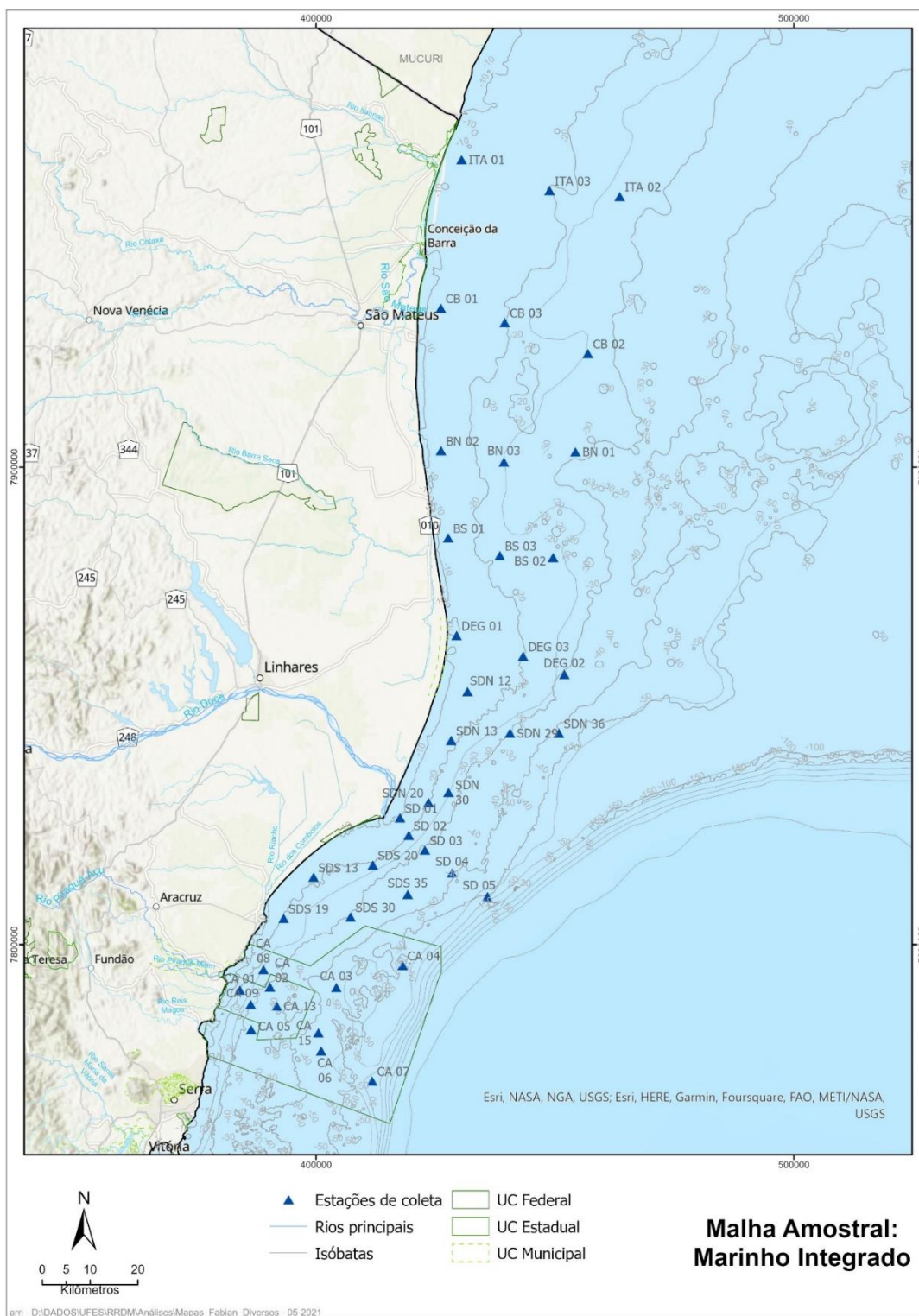
5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
Meta 1 - Análise espaço-temporal da variação da densidade dos ovos e larvas de peixes na foz do Rio Doce e região costeira adjacente; - Avaliação de possíveis áreas de desova através da densidade de ovos; - Acompanhamento dos primeiros estádios de desenvolvimento para avaliar o recrutamento através da distribuição das densidades de larvas de peixes.	Rafael França Marta Quintas Fabiana Bonecker Luiz Cosenza
Meta 2 - Variação sazonal da relação ovos viáveis x não viáveis; - Análise das alterações da comunidade de ovos de peixes; - Influência dos metais oriundos do rejeito da barragem na taxa de eclosão dos ovos e peixes; - Causas possíveis das relações da não viabilidade dos ovos.	Ana Carolina Valente Luiz Cosenza Cristina Dias Márcia Castro Ana Bonecker
Meta 3 - Comparar os resultados encontrados com os dados pretéritos na área da foz do Rio Doce e região costeira adjacente; - Variação da abundância relativa e frequência de ocorrência espacial e temporalmente; - Análise das alterações das assembleias de larvas de peixes; - Correlação dos parâmetros abióticos (físico-químicos, nutrientes e metais) com os bióticos (densidades, abundância relativa, frequência de ocorrência, diversidade, riqueza de ovos e larvas de peixes).	Cristina Dias Marta Quintas Fabiana Bonecker Rafael França Ana Carolina F. Valente Márcia Castro Ana Bonecker
Meta 4 - Acompanhar a distribuição espacial e temporal das larvas de peixes com deformidades.	Cristina Dias Fabiana Bonecker Márcia Castro Ana Bonecker

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

As coletas serão realizadas trimestralmente em 42 estações distribuídas na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Figura 9).

Figura 9: Mapa com as estações de coleta.



6.2. Metodologia de coleta

6.2.1. Meta 1, Meta 2, Meta 3 e Meta 4 – Amostragem da camada superficial

A camada subsuperficial será amostrada trimestralmente utilizando uma rede neustônica (Hydro-Bios modelo David/Hempel). Esta rede é constituída por duas redes de 400 cm de comprimento presas a duas bocas retangulares de 15 cm de altura por 30 cm de largura cada, sustentadas por uma armação tipo catamarã sendo arrastadas horizontalmente. A rede superior fica na interface emersa e submersa capturando os organismos das camadas superficiais (0~15 cm de profundidade), enquanto que a rede inferior fica totalmente submersa durante todo o tempo, coletando os organismos das camadas subsuperficiais (15~30 cm de profundidade). As malhas das duas redes são de 500 μm de abertura. Os arrastos serão feitos em círculos de modo que a rede não fique na esteira do navio. A velocidade será de cerca de três nós e o tempo de arrasto será de 10 minutos. Logo após a coleta, as amostras serão fixadas em solução de formaldeído diluído a 4% e tamponado com tetraborato de sódio à razão de 20 g.L^{-1} .

O volume de água filtrada será estimado através do fluxômetro, previamente aferido, preso na rede inferior. O volume da rede superior será estimado através da superfície da área arrastada pela rede.

6.2.2. Meta 1, Meta 2, Meta 3 e Meta 4 – Amostragem da coluna de água

O ictioplâncton será coletado por arrastos oblíquos com rede bongô, desde próximo ao fundo até a superfície, segundo as recomendações de Smith e Richardson (1977). A rede bongô é formada por duas redes cônico-cilíndricas, com 60 cm de diâmetro e aberturas de malha de 500 μm . As redes serão equipadas com fluxômetros previamente aferidos. A velocidade de arrasto será de aproximadamente 2 nós, com duração média de 10 minutos.

Imediatamente após a coleta, as amostras serão fixadas em solução de formaldeído diluído a 4%, previamente tamponado com tetraborato de sódio (20 g.L^{-1}).

6.3. Meta 1, Meta 2, Meta 3 e Meta 4 – Metodologia de laboratório

Os ovos e larvas de peixes serão totalmente triados das amostras das redes neustônica e bongô sob microscópio estereoscópico. Os ovos de peixes serão preservados em solução de formaldeído tamponado a 4% e as larvas de peixes serão preservadas em álcool 70%, com exceção das larvas do grupo *leptocephali* que serão preservadas em formaldeído tamponado a 4%.

O número total de ovos e larvas de peixes obtidos será expresso por 100 metros cúbicos de água filtrada (inds.100 m^{-3}). O volume de água filtrada pela rede será estimado através da fórmula: $V=a.n.c$

Onde: V= volume de água filtrada (m^3); a= área da boca da rede; n= número de rotações (rot); e, c= fator de aferição do fluxômetro após calibração do aparelho.

A abundância de ovos e larvas coletadas (ind.m^{-3}) será extrapolada para um volume padrão utilizando-se a fórmula:

$$y = (x.V^{-1})$$

Onde: y = densidade de ovos ou larvas de peixes; x = número de ovos ou larvas coletadas na amostra; e, V = volume de água filtrada pela rede (m³).

A identificação do ictioplâncton será realizada até o menor nível taxonômico possível, utilizando alguns parâmetros merísticos e morfométricos, com auxílio de microscópio estereoscópico. Serão utilizadas bibliografias especializadas, tais como: Richards (2006), Bonecker e Castro (2006), Fahay (2007), Bonecker *et al.* (2014), entre outros. O inventário de larvas de peixes será baseado na classificação de Nelson *et al.* (2016). Todos os nomes dos táxons identificados nesse estudo serão conferidos em Fricke *et al.* (2022).

Em estudo realizado em 2016 no pré-PMBA/Fest-RRDM foram registradas larvas de peixes de diferentes espécies com tratos digestórios danificados (BONECKER *et al.*, 2019). Nesse estudo observou-se a relação destas larvas com altas concentrações de metais presentes no ambiente marinho, principalmente ferro e manganês. Larvas de peixes com essas características representaram até 7,4% do total de larvas capturadas na porção norte da área de estudo (BONECKER *et al.*, 2019). A partir desses resultados observados no pré-PMBA/Fest-RRDM decidiu-se utilizar a presença dessas larvas como possível indicador de influência da pluma oriunda do acidente no ambiente marinho sobre o ictioplâncton. Larvas destruídas são comuns em amostras de plâncton, entretanto, o tipo de dano observado somente na região do trato digestório indicou uma condição diferente sugerindo que essas larvas foram afetadas por condições ambientais.

Após a identificação o material será depositado na coleção do Laboratório Integrado de Zooplâncton e Ictioplâncton do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde serão realizadas todas as análises.

Serão entregues mensalmente os resultados dos valores brutos e as densidades de ovos e larvas de peixes registrados nas amostras coletadas com a rede neustônica e com a rede bongô. Ao final dos 23 meses de estudo será entregue um relatório contendo os resultados referentes a todas as campanhas realizadas.

6.4. Meta 1, Meta 2, Meta 3 e Meta 4 – Análise dos dados

Serão calculados os índices ecológicos (riqueza, diversidade e equitabilidade). O índice de diversidade de Shannon-Wiener relaciona a frequência relativa de diferentes espécies na amostra podendo alcançar valores altos quando todas as espécies se distribuem homogeneamente na amostra (LEGENDRE e LEGENDRE, 1998). Porém, em amostras com baixo número de táxons, para as quais os índices de diversidade absoluta apresentam geralmente valores artificiais, é importante associar o Índice Relativo de Equitabilidade na interpretação ecológica dos resultados. Esse índice varia entre 0 (equitabilidade é mínima) e 1 (equitabilidade é máxima). Para o cálculo desses índices serão considerados os indivíduos identificados até o nível taxonômico de espécie e as demais categorias que representavam apenas um táxon (WU, 1982).

Os dados de abundância de ovos e larvas de peixes e de diversidade serão testados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk's. O teste parte da hipótese nula (H_0) considerando a distribuição dos dados ser normal. Se o valor de p é menor que o nível estabelecido (5%), então tem indícios para descartar a normalidade dos dados, passando a se utilizar análises não paramétricas (ZAR, 2010).

O teste não paramétrico de Mann-Whitney(U) (ZAR, 2010) será usado para verificar a existência de diferenças entre a rede de nêuston superior e inferior e as duas redes da bongô. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) (ZAR, 2010) será usado para avaliar a existência de diferenças entre os quatro setores (APA Costa das Algas, Foz do Rio Doce, Norte e Abrolhos) e entre as campanhas que serão realizadas. O teste não paramétrico de Mann-Whitney (ZAR, 2010) será utilizado também para comparar os períodos de maior e menor vazão do Rio Doce. Os testes de Shapiro-Wilk's, Mann-Whitneye Kruskal-Wallis serão realizados no Programa estatístico Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

Serão calculadas as curvas cumulativas de espécies para as amostras coletadas na superfície e na coluna de água pelos métodos de Chao, Jackknife1, Jackknife2 e Bootstrap. A proposta dessas curvas é que elas representem o número de espécies identificadas, plotadas em um gráfico que nos indique qual foi a quantidade de esforços empregados para se inventariar uma área (COLWELL e CODDINGTON, 1994). Através da observação desta curva será possível fazer uma previsão de quantas espécies ainda podem vir a ser encontradas na área de estudo, comparando com levantamentos pretéritos.

Serão realizadas também análises de similaridade (ANOSIM) para verificar se haverá diferença significativa na composição das assembleias de larvas de peixes em relação aos setores, as campanhas, aos períodos de maior e menor vazão do rio, além de outras variáveis importante para verificar a influência da pluma de rejeito. Para identificar aquelas espécies que mais contribuíram para as similaridades serão feitos os testes de porcentagem de similaridade (SIMPER) (CLARKE e WARWICK, 1994). Os dados de abundância das espécies ictioplanctônicas serão transformados através da expressão $\log(x+1)$, para diminuir as variações entre as abundâncias dos táxons mais numerosos e os mais raros. O coeficiente de similaridade de Bray-Curtis será utilizando, uma vez que não é afetado pelas múltiplas ausências e confere mais peso às espécies mais abundantes em relação às mais raras (CLARKE e WARWICK, 1994). Será utilizado o teste com esquema de uma via (que considera apenas um fator) com 999 permutações. A correlação é considerada significativa quando o nível de significância for menor que 5%. As análises de curva cumulativa de espécies, ANOSIM e SIMPER serão realizadas no programa estatístico Primer, versão 6 (Primer-ELtda).

A influência dos parâmetros ambientais e metais (dissolvidos e particulados) na estrutura das assembleias do ictioplâncton será testada usando GLMs (modelos lineares generalizados) com a família de distribuição Gama. Os descritores serão os parâmetros biológicos tais como: abundância de ovos e larvas de peixes, diversidade entre outros; enquanto os parâmetros ambientais e os metais serão as variáveis preditoras. A escolha dos parâmetros utilizados como variáveis preditoras serão realizadas com base em análise exploratória prévia (Análise de Componentes Principais - ACP),

selecionando os principais parâmetros responsáveis pela formação dos eixos principais. Inicialmente, um modelo completo será desenhado usando todas as variáveis preditoras, e então modelos biologicamente lógicos serão construídos contendo menos variáveis. A partir dos resultados deste modelo completo, modelos biologicamente importantes serão projetados contendo menos variáveis preditoras. O critério de informação de Akaike para pequenas amostras (AICc) será usado para selecionar o melhor modelo. O modelo com o menor AICc será considerado o mais plausível para a descrição dos dados, e a importância dos modelos alternativos será estimada a partir da diferença entre os valores do AIC ($\Delta AICc$). Modelos com $\Delta AICc \leq 2$ também serão considerados plausíveis (BURNHAM e ANDERSON, 2002). As GLMs (HEIBERGER e HOLLAND, 2015) serão realizadas usando o pacote MuMIn (BARTON, 2013). Essas análises serão realizadas em R 3.6.3 (R Development Core Team, 2020).

Além destas análises poderão ser utilizadas outras que melhor descrevam os resultados obtidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, K. *MuMIn: Multi-model inference. R package version 1.10.0.1*. 2013.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D.R. *Model Selection and Multimodel Inference. A Practical Information-Theoretic Approach*. Springer-Verlag, New York. 2002.

BONECKER, A.C.T.; CASTRO, M.S. *Atlas de larvas de peixes da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira*. Museu Nacional Série Livros n. 19. Rio de Janeiro. 2006. 216 p.

BONECKER, A. C. T. et al. *Catálogo dos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes da bacia de Campos*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Zoologia: guias e manuais de identificação séries. Disponível em <<http://books.scielo.org>>, 2014. 295 p.

BONECKER, A. C. T. et al. Larval fish assemblages of the coastal area affected by the tailings of the collapsed dam in southeast Brazil. *Regional Studies in Marine Science*, v. 32. 100848. 2019. 10.1016/j.rsma.2019.100848.

CLARKE, K.R.; WARWICK, R. M. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Natural Environmental Council, Plymouth Laboratories, Plymouth. 2nd Edition. 2001.

COLWELL, R. K.; CODDINGTON J.A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos. Transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences*, v. 345: 101-118, 1994.

FAHAY, M.P. *Early Stages of Fishes in the Western North Atlantic Ocean (Davis Strait, Southern Greenland and Flemish Cap to Cape Hatteras)*. Northwest Atlantic Fisheries Organization. Nova Scotia, Canadá: 1696 p. 2007.

FONSECA, V. F. et al. Fish community-based measures of estuarine ecological quality and pressure-

impact relationships. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 134, p. 128-137, 2013.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. (Eds.). *Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, species, references*. 2021.

(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 14/06/2022.

HEIBERGER, R.M.; HOLLAND, B. *Statistical Analysis and Data Display: An Intermediate Course with Examples in R*. Springer-Verlag, New York. 2015.

KHOSHNOOD, Z. Effects of environmental pollution on fish: a short review. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, v. 19, n. 1, p. 49-60, 2017.

LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. *Numerical Ecology*. 2nd English edition. Developments in environmental Modelling, 20, Elsevier, New York, 853 p. 1998.

NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON, M.V. H. *Fishes of the world*. 5ª edição. John Wiley & Sons. New Jersey. 752 p. 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2010. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.r-project.org> (acessado 14/06/2022).

RICHARDS, W.J. *Early stages of Atlantic fishes: an identification guide for the Western North Atlantic*. Volume I. and Volume II. CRC Press, Boca Raton, Florida: 2640 p. 2006.

SANTOS, R. V. S.; RAMOS, S.; BONECKER, A. C. T. Can we assess the ecological status of estuaries based on larval fish assemblages? *Marine Pollution Bulletin*, v. 367, p. 367-375, 2017. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.043.

SMITH, P.E.; RICHARDSON, S.L. Standard techniques for pelagic fish egg and larva survey. *FAO, Fish. Tech. Pap.*, v. 175, p. 1-100, 1977.

STRYDOM, N. A. Patterns in larval fish diversity, abundance, and distribution in temperate South African estuaries. *Estuaries and Coasts*, v. 38, p. 268-284, 2015.

WESTERNHAGEN, H. V.; DETHLEFSEN, V.; HAARICH, M. Can a pollution event be detected using a single biological effects monitoring method? *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, p. 294-297, 2001.

WU, R.S.S. Effects of taxonomic uncertainty on species diversity indices. *Marine Environmental Research*, v. 6, p. 215-225, 1982.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall/Pearson, 5.ed, Upper Saddle River, 944p. 2010. <https://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=FRD&id=6210>. Acessado em 14/06/2022.

BENTOS DE SUBSTRATO INCONSOLIDADO

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Leila de Lourdes Longo	Coordenador	UFRB
Adriane Araújo Braga	Pesquisador Doutor	UFES - Alegre
Mariane Rosa Thomaz da Silva	Profissional Júnior	UFRB
Luan Cerqueira de Oliveira	Profissional Júnior	UFES - Alegre
Adreani Araújo da Conceição	Mestre/ Profissional Pleno I	UFRB
Annie da Silva Cassamali	Mestre/ Profissional Pleno I	UFES - Alegre
Renata de Oliveira Patrício	Técnico Graduado	UFRB
A definir	Técnico Graduado	UFES - Alegre
A definir	Pós-Doutorado	UFRB
A definir	Pós-Doutorado	UFES - Alegre
Crislane Barbosa das Neves	Iniciação Científica	UFRB
João Victor dos Anjos da Silva	Iniciação Científica	UFRB
A definir	Iniciação Científica	UFRB
A definir	Iniciação Científica	UFRB
A definir	Iniciação Científica	UFRB
A definir	Iniciação Científica	UFRB
Emilayne Vitoria Pimenta Ferreira	Iniciação Científica	UFES - Alegre
Marcos Antonio Rocha Hehr	Iniciação Científica	UFES - Alegre
Thiago Cazoni	Iniciação Científica	UFES - Alegre
A definir	Iniciação Científica	UFES - Alegre
A definir	Iniciação Científica	UFES - Alegre
A definir	Iniciação Científica	UFES - Alegre

2. ESCOPO

A comunidade bentônica apresenta papel fundamental em diversos processos ecossistêmicos marinhos, tais como a ciclagem de nutrientes e a produtividade secundária, além de sua importância como elo das teias alimentares (Snelgrove, 1998; Heilskov; Holmer, 2001). Cada táxon representa parte funcional de um habitat, constituído pela sua interação com o meio em que vivem, e com as demais espécies (Longo; Amado-Filho, 2014). Assim, estudos sobre a estrutura de comunidade em um determinado ecossistema são essenciais para a compreensão de diversos aspectos da fauna bentônica (Braga, et al., 2005). Neste aspecto, as alterações descritas na composição faunística e abundância de espécies trazem informações sobre a estrutura funcional ecológica destas comunidades bentônicas, uma vez que os diferentes grupos taxonômicos possuem funções ecológicas específicas e a perda de organismos compromete o seu funcionamento (Snelgrove, 1997; 1998). Estudos em áreas impactadas relatam alterações drásticas na composição e abundância de comunidades bentônicas, com maiores abundâncias de espécies resistentes, especialmente para contaminação de metais (Paixão et al., 2010; Zalmon et al., 2015; Gollner et al., 2017; Matthews-Cascon et al., 2018; Bernardino et al., 2019; Nascimento et al., 2022).

Bremner et al (2003) ressaltaram que alterações nas espécies podem manter a funcionalidade

ecológica da comunidade, entretanto, para se conhecer o processo de substituição de espécies e seu papel funcional no ambiente, são necessários monitoramento de longa duração em áreas impactadas. Estes estudos são fundamentais para se conhecer a capacidade de recuperação e a resiliência das espécies. Nesta mesma linha, Washburn et al (2019) mencionaram a importância de se conhecer as fontes dos riscos para que se possa avaliar os seus efeitos ecológicos, como no caso de mineração, cujos efeitos envolvem a alteração do ambiente, suspensão da pluma e disponibilização de contaminantes.

As questões chaves sobre a resistência e resiliência dos grupos taxonômicos bentônicos; sobre a recolonização das áreas impactadas pelos mesmos grupos funcionais e sobre os processos de recuperação ambiental, só podem ser respondidas com estudos de monitoramento de longa duração sobre a estrutura funcional ecológica destas comunidades.

Desta forma, o presente estudo tem como escopo fundamental caracterizar a estrutura das comunidades bentônicas em áreas sob influência dos impactos oriundos do rompimento da barragem de Fundão (Mariana-MG), ao longo do período de estudo, especialmente a partir das seguintes hipóteses:

- A estrutura da comunidade macrobentônica não varia entre os setores e campanhas;
- A estrutura da comunidade macrobentônica varia entre os setores e campanhas e a quantidade de variação encontrada é explicada apenas pelas variáveis ambientais;
- A variação encontrada é explicada pelo conjunto de variáveis ambientais e contaminantes que possuem ligação com o rejeito proveniente do rompimento da barragem de Fundão, principalmente metais e sedimentos;
- A influência dos contaminantes do rejeito proveniente do rompimento da barragem de Fundão, estará mais evidente na região próxima da foz do Rio Doce e nos períodos de maior vazão.

3. OBJETIVO

Elucidar os possíveis efeitos da chegada dos rejeitos (variáveis sedimentológicas e químicas) decorrentes do rompimento da barragem de Fundão em Mariana/MG e sua extensão no ambiente marinho através do estudo da variação espacial e temporal da estrutura da comunidade (Riqueza, Abundância, Diversidade, Dominância e Equitabilidade) macrobentônica em fundos inconsolidados.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Lista taxonômica e quantificação dos organismos por unidade amostral, ao longo do período de estudo

Justificativa:

A triagem, identificação e quantificação dos organismos da fauna bentônica consistem na análise dos descritores simples da comunidade, como Riqueza (número de espécies – lista taxonômica) e Abundância (quantificação dos organismos), neste caso utilizando como métrica a densidade de organismos, ou seja, número de indivíduos por volume (ml) de amostras triadas. Estes fatores são fundamentais para a análise e compreensão da estrutura de comunidades, no que se refere à composição faunística, abundância dos organismos, utilização dos recursos do habitat pelos organismos (Diversidade, Dominância e Equitabilidade), que permitem a descrição e monitoramento da resposta desta comunidade aos fatores ambientais.

META 2 – Descrever a estrutura das comunidades, com base em seus descritores clássicos (Riqueza, Abundância, Diversidade, Dominância e Equitabilidade) nas unidades amostrais ao longo do período de estudo

Justificativa:

A partir dos dados gerados na Meta 1 (Riqueza e Abundância), serão analisadas as estruturas das comunidades da área amostral, no que se refere à composição faunística, abundância dos organismos, utilização dos recursos do habitat pelos organismos (Diversidade, Dominância e Equitabilidade), que permitem a descrição e monitoramento da resposta desta comunidade aos fatores ambientais.

META 3 – Correlacionar as variáveis sedimentológicas e químicas aos descritores da estrutura de comunidade nas unidades amostrais, ao longo do período de estudo

Justificativa:

Uma vez obtidos os dados sobre a estrutura das comunidades nas unidades amostrais e identificadas as respostas dos organismos ao ambiente (Meta 2), serão conduzidas as análises integradas de dados gerados pelas equipes de Sedimentologia e Hidrogeoquímica, com o objetivo de identificar quais os fatores ambientais que estão associados às respostas dos organismos em cada unidade amostral.

META 4 – Avaliar a interferência dos dados abióticos nas respostas das comunidades bentônicas no contexto espacial da área amostral, ao longo do período de estudo

Justificativa:

Os resultados das análises integradas dos dados bióticos (respostas da comunidade bentônica) e dados abióticos (Sedimentologia e Hidrogeoquímica) nas unidades amostrais (Meta 3), serão avaliados no contexto espacial da área de estudo, de forma a compreendermos a amplitude da área efetivamente

sob impacto destes fatores ambientais. Estas informações fornecem ainda os subsídios fundamentais para o dimensionamento de áreas não impactadas e sua capacidade como ambiente estoque para o processo de mitigação e recuperação das comunidades sob impacto.

META 5 – Produzir mapas de ocorrência e abundância dos organismos associados aos fatores ambientais na área amostral ao longo do período de estudo, contribuindo com o aspecto biótico do mapeamento de habitats proposto pelo projeto

Justificativa:

A partir da compilação dos dados gerados na Meta 4, a plotagem dos resultados associados aos dados de faciologia, dinâmica sedimentar e morfologia de fundo, produzidos pela equipe de Mapeamento de Habitats, compõe efetivamente o mapeamento de habitats para a área de estudo, fornecendo um cenário mais complexo, tanto das áreas sob impacto, como não impactadas, fundamentais para planejamento de manejo e recuperação dos ecossistemas.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Lista taxonômica e quantificação dos organismos por unidade amostral;	Leila de Lourdes Longo Adriane Cristina Araújo Braga
- Planilhas com valores dos índices que descrevem a estrutura de comunidades nas unidades amostrais (Riqueza, Abundância, Diversidade, Dominância e Equitabilidade).	

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Estudos taxonômicos dos organismos com produção de lista de identificação até as categorias taxonômicas possíveis para cada grupo;	Leila de Lourdes Longo Adriane Cristina Araújo Braga
- Análises de Índices Ecológicos e Descritores de Comunidades, caracterizando a estrutura das comunidades nas unidades amostrais;	
- Análises multivariadas integrando os dados bióticos (respostas das comunidades bentônicas) aos dados abióticos (Sedimentologia e Hidrogeoquímica), evidenciando os fatores causais para as variações nas estruturas das comunidades bentônicas, em diferentes escalas espaciais;	
- Construção de mapas de ocorrência e abundância dos organismos associados aos fatores ambientais na área amostral.	

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

As informações sobre a localização das amostras que serão coletadas para análise de bentos de substrato inconsolidado na plataforma continental são apresentadas na Figura 10 e Tabela 2. As amostras serão coletadas trimestralmente, em todos os pontos amostrais apresentados.

Figura 10: Distribuição dos pontos amostrais de monitoramento na Foz do Rio Doce e na plataforma continental adjacente. Os pontos representados com triângulos azuis constituem a malha amostral do Marinho Integrado adotadas para a análise da fauna bentônica.

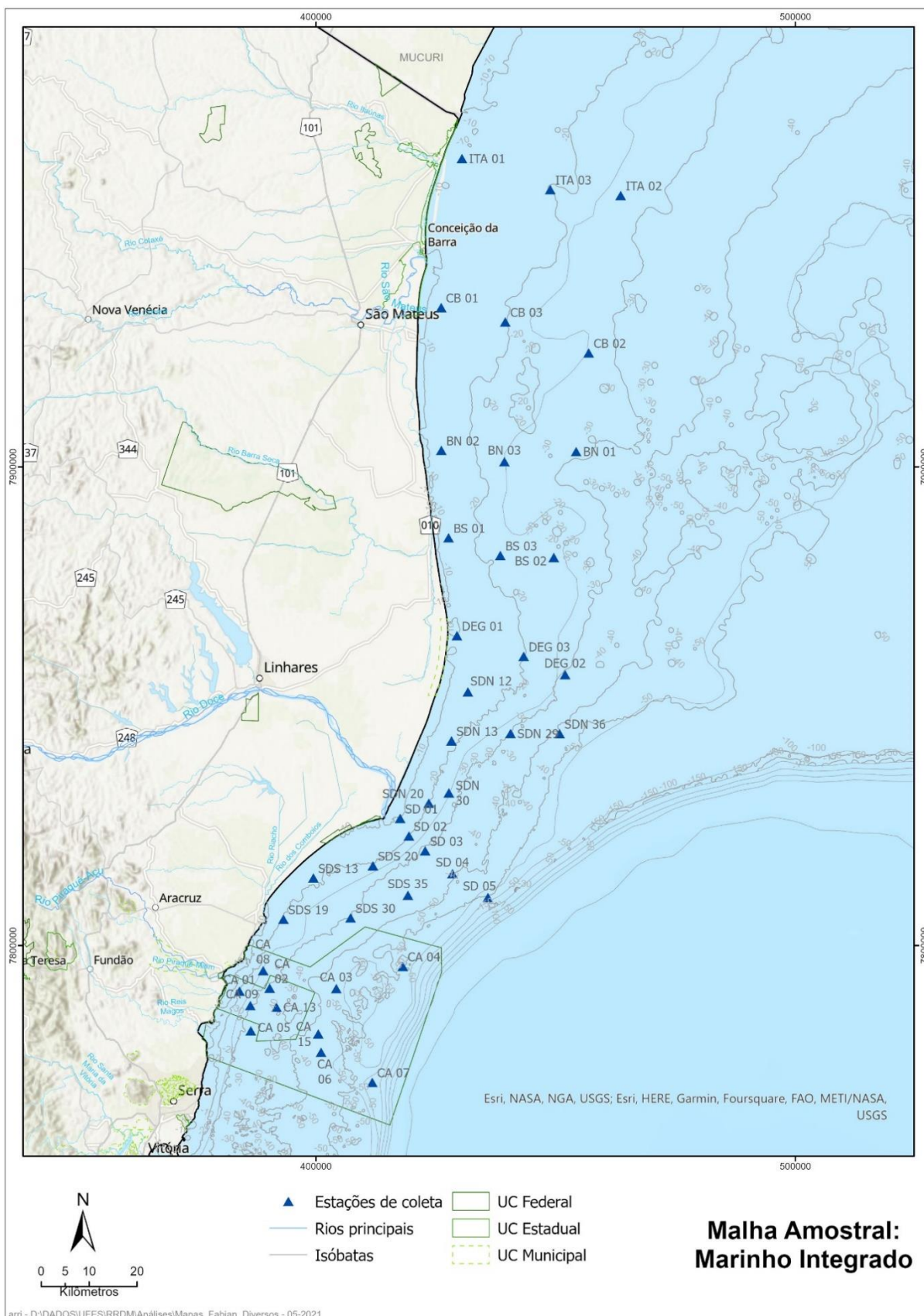


Tabela 2 Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem a serem monitorados na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente.

Localidade	Lat	Long
Costa das algas – CA01	-19,977583	-40,108306
Costa das algas – CA02	-19,972194	-40,048111
Costa das algas – CA03	-19,973833	-39,915306
Costa das algas – CA04	-19,932611	-39,782583
Costa das algas – CA05	-20,052502	-40,086248
Costa das algas – CA06	-20,093839	-39,946339
Costa das algas – CA07	-20,151074	-39,844587
Costa das algas – CA08	-19,939167	-40,060833
Costa das algas – CA09	-20,005000	-40,146739
Costa das algas – CA013	-20,008200	-40,034900
Costa das algas – CA015	-20,059200	-39,951800
Foz do Rio Doce – SDN12	-19,414952	-39,650712
Foz do Rio Doce – SDN29	-19,492450	-39,568200
Foz do Rio Doce – SDN13	-19,507056	-39,683611
Foz do Rio Doce – SDN30	-19,605417	-39,689250
Foz do Rio Doce – SDN(?)	A definir	A definir
Foz do Rio Doce – SDN20	-19,624583	-39,729278
Foz do Rio Doce – SD01	-19,653167	-39,786389
Foz do Rio Doce – SD02	-19,686389	-39,769056
Foz do Rio Doce – SD03	-19,714556	-39,736972
Foz do Rio Doce – SD04	-19,757861	-39,682778
Foz do Rio Doce – SD05	-19,823330	-39,593330
Foz do Rio Doce – SDS30	-19,840528	-39,886139
Foz do Rio Doce – SDS20	-19,742333	-39,841028
Foz do Rio Doce – SDS13	-19,764722	-39,959694
Foz do Rio Doce – SDS19	-19,841430	-40,019540
Foz do Rio Doce – SDS35	-19,798230	-39,772810
Degredo – DEG01	-19,308584	-39,671964
Degredo – DEG02	-19,382999	-39,457405
Degredo – DEG03	A definir	A definir
Barra Seca – BS01	-19,123450	-39,687600
Barra Seca – BS02	-19,159000	-39,485810
Barra Seca – BS03	A definir	A definir
Barra Nova - BN02	-18,958668	-39,701499
Barra Nova - BN01	-18,961848	-39,434400
Barra Nova - BN03	A definir	A definir
Conceição da Barra – CB01	-18,690220	-39,703280
Conceição da Barra – CB02	A definir	A definir
Conceição da Barra – CB03	A definir	A definir
Itaúnas - ITA01	-18,408001	-39,658504
Itaúnas - ITA02	-18,478489	-39,345227
Itaúnas - ITA03	A definir	A definir

6.2. Coleta de amostras (Meta 1)

Este tema é parte do Marinho Integrado, onde as coletas de amostras são realizadas nas mesmas malha e frequência amostrais, bem como utilizando amostradores comuns para os mesmos estudos, como Bentos de Substrato Inconsolidado (apresentado aqui), Sedimentologia e Hidrogeoquímica.

As amostras serão coletadas em substrato inconsolidado por meio do lançamento de amostrador tradicional (van Veen), com volume mínimo de 15 litros, apropriado para este ambiente. Cada amostra receberá uma etiqueta com o código do local de coleta, data, profundidade, número sequencial correspondente. Essa etiqueta deverá ser confeccionada em papel vegetal e acondicionada em saco plástico vedado para evitar danos e consequente perda de informações. Para registro do campo, o coletor/pesquisador levará uma tabela das amostras para anotação de todas as informações que

constam nas etiquetas, bem como outras observações sobre local/condição climáticas durante a coleta e código da expedição para que se tenha absoluto controle do material coletado.

Para cada pegada, assim que retirado da água, o amostrador será posicionado fechado dentro de bandejas de plástico e seguidos os protocolos de manipulação específicos para as amostras das equipes de Sedimentologia e Hidrogeoquímica. Estas amostras serão retiradas antes da adição de formalina 10% para preservação da comunidade bentônica.

Na sequência, as amostras serão transferidas para sacolas plásticas dispostas uma dentro da outra (duplas) com a etiqueta colocada entre elas. Será, então, adicionado a formalina 10% até cobrir o volume de sedimento coletado e as sacolas serão fechadas de forma a impedir a perda do líquido conservante. As sacolas serão mantidas em bombonas de 50 l.

As amostras serão enviadas, para os laboratórios envolvidos no projeto: LABINMAR – Laboratório de Invertebrados Marinhos - UFES, Alegre, ES; LABMACRO – Laboratório de Macroinvertebrados Bentônicos - UFRB, Cruz das Almas, BA.

6.3. Processamento das amostras em laboratório (Meta 1)

Nestes laboratórios as amostras serão lavadas em peneiras granulométricas de 0,63 μm para separação da fauna bentônica. De cada amostra serão tiradas três (3) alíquotas de 100 ml para triagem, identificação e quantificação dos organismos. Este procedimento será conduzido sob microscópio estereoscópico e microscópio óptico. Os organismos serão identificados até o nível taxonômico possível para cada grupo.

6.4. Análise dos dados (Meta 2, Meta 3, Meta 4, Meta 5)

Serão analisados os descritores da estrutura das comunidades bentônicas na dimensão espacial da área amostral, durante o período do monitoramento. Para a análise da Riqueza (S) serão identificados os organismos quanto aos grandes grupos taxonômicos, com detalhamento até a categoria taxonômica possível. Da mesma forma, os organismos serão quantificados para determinação da abundância, representada em Densidade (número de indivíduos/volume de amostra triada). A partir destas informações, serão analisados os descritores sintéticos clássicos de comunidade, Dominância, Equitabilidade e Diversidade, além do papel funcional destes organismos nas comunidades.

Análises univariadas e multivariadas serão conduzidas na integração dos dados bióticos obtidos por esta equipe de bentos e os abióticos gerados pela equipe de Sedimentologia e Hidrogeoquímica (compostos químicos na água de fundo, no material particulado em suspensão e no sedimento), para a descrição da associação entre as respostas da comunidade bentônica e os fatores ambientais analisados.

Os resultados serão ainda compilados e plotados em mapas de ocorrência e abundância de espécies associadas aos fatores ambientais e as informações sobre faciologia, dinâmica sedimentar e geomorfologia de fundo, produzidas pela equipe de Mapeamento de Habitats.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDINO, A.F., PAIS, F.S., OLIVEIRA, L.S., GABRIEL, F.A., FERREIRA, T.O., QUEIROZ, H.M., MAZZUCO, A.C.A. 2019. Chronic trace metals effects of mine tailings on estuarine assemblages revealed by environmental DNA. *PeerJ* 2019, 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.8042>.
- BRAGA, A.A.; FRANSOZO, A.; BERTINI, G. FUMIS, P. B. 2005. Composição e abundância dos caranguejos (Decapoda, Brachyura) nas Regiões De Ubatuba e Caraguatatuba, Litoral Norte Paulista, Brasil. *Biota Neotropica*. V 1: 1-34.
- BREMNER, J.; ROGERS, S. I.; FRID C. L. J. 2003. Assessing functional diversity in marine benthic ecosystems: a comparison of approaches. *Mar Ecol Prog Ser*. 254: 11–25.
- GOLLNER, S. et al. 2017. Resilience of benthic deep-sea fauna to mining activities. *Mar. Environm. Res*. 129: 76-101.
- HEILSKOV, A. C. H., HOLMER, M. 2001. Effects of benthic fauna on organic matter mineralization in fish-farm sediments: importance of size and abundance. *ICES Journal of Marine Science* 58: 427 – 434.
- LONGO, L. L.; AMADO-FILHO, G. M. 2014. O conhecimento da fauna marinha bentônica brasileira através dos tempos. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro, 21 (3): 995 - 1010.
- MATTHEWS-CASCON, H., BEZERRA, L. E. A., BARROSO, C. X., RABAYA, S. G., MOREIRA, A. K., ROCHA, V. P., SOARES, M. O. S. 2018. Marine benthic communities affected by the Doce River (southwestern Atlantic): Baseline before a mining disaster. *Marine Pollution Bulletin*, 135: 1000–1006.
- NASCIMENTO, R.L., ALVES, P.R., M. DI DOMENICO, ET AL. 2022. The Fundão dam failure: Iron ore tailing impact on marine benthic macrofauna, *Science of the Total Environment* 838, 156205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156205>
- PAIXÃO, J.F., OLIVEIRA, O.M.C., DOMINGUEZ, J.M.L., COELHO, A.C.D., GARCIA, K.S., 2010. Relationship of metal content and bioavailability with benthic macrofauna in Camamu Bay (Bahia, Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 60: 474–481 p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.002>.
- SNELGROVE, P. V. R. 1997. The Importance of Marine Sediment Biodiversity in Ecosystem Processes. *Ambio*, 26 (8): 578-583.
- SNELGROVE, P. V. R. 1998. The biodiversity of macro-faunal organisms in marine sediments. *Biodiversity Conservation*, 7: 1123 – 1132.

WASHBURN, T. W. et al. 2019. Ecological risk assessment for deep sea mining. *Ocean and Coastal management*, 176: 24-39.

ZALMON, I.R., REZENDE, C.E., VELOSO, V.G., SALLORENZO, I., PARANHOS, R., FALCÃO, A.P., ALMEIDA, T.C.M. 2015. Influence of estuarine dynamics on macrobenthos spatial variability along the southeast continental shelf of Brazil. *Sci. Mar.* 79 (3): 379–391. <https://doi.org/10.3989/scimar.04196.18A>.

FUNDOS RECIFAIS E BANCOS DE RODOLITOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Rodrigo Leão de Moura	Coordenador	Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Paulo Sergio Salomon	Pesquisador	Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Lelis Antonio Carlos Jr.	Pesquisador	Pontifícia Universidade Católica (PUC-RJ)
Leonardo Tavares Salgado	Pesquisador	Inst. de Pesquisas Jardim Botânico do RJ (JBRJ)
Rodrigo Gomes B. Silva	Técnico	UFRJ
Dilson S. Cajueiro Fo	Técnico	UFRJ
Pós-Doutorando(a)	Pesquisador (a): Análise e modelagem de dados	UFRJ
Pós-Doutorando(a)	Pesquisador (a): Campanhas campo, experimentos de transp. e colonização	UFRJ
Pós-Doutorando(a)	Pesquisador (a): Campanhas amostrais, análises c/ ferramentas moleculares	UFRJ
Pós-Doutorando(a)	Pesquisador (a): Diversidade genética de simbiontes / corais	UFRJ
Pós-Doutorando(a)	Pesquisador (a): Camp. amostrais, análises c/ fotoquadrados, dropcams e ortomosaicos	UFRJ
Pós-Doutorando(a)	Pesquisador (a): Análises cristalográficas, ultraestruturais e de composição elementar	JBRJ
Bolsista DCTI (n=5 bolsistas)	Pesquisador (a): Campanhas amostrais, processamento de dados	UFRJ
Bolsistas Inic. Científica (n=10 bolsistas)	Pesquisador: Apoio à execução; capacitação de rec. humanos	UFRJ

* Não inclui STPJ/MEI

2. ESCOPO

O colapso da barragem de Fundão (Mariana, MG), em 5 de novembro de 2015, configurou-se como o maior desastre minerário da história. Cerca de 20×10^6 m³ de rejeitos transpuseram a barragem da UHE Risoleta Neves e foram transportados para o curso mais baixo do Rio Doce até alcançar a foz, 17 dias depois (Lima et al., 2020). O ritmo e volume do escoamento do material carregado entre o compartimento fluvial e o estuário, e entre o estuário e o mar, permanece pouco conhecido. Além disso, resta esclarecer a extensão e a magnitude da contaminação marinha, considerando os aportes crônicos e a remobilização/transporte de contaminantes (Segura et al., 2016; Hatje et al., 2017). Modelagens numéricas e estudos baseados em sensoriamento remoto têm buscado representar a dispersão da pluma no mar (e.g. Francini-Filho et al., 2019; Magris et al., 2019). No entanto, a avaliação do alcance, persistência e efeitos do material associado ao evento, particulado e dissolvido, depende de medições *in situ* em diversas matrizes e ambientes (e.g. Andrades et al., 2020, 2022; Costa et al., 2021). Embora tenha ocorrido melhora na qualidade ambiental da bacia hidrográfica, existem lacunas persistentes para

a restauração de ecossistemas costeiros e marinhos, visto que não existem estudos para embasar ou testar intervenções específicas. Trata-se de um contexto no qual é imperativo que ecossistemas criticamente importantes, sensíveis e ameaçados (iucnrl.org), tais como recifes e bancos de rodolitos, sejam monitorados para subsidiar medidas custo-efetivas de mitigação e recuperação dos danos, ou mesmo de compensação (e.g. Silva-Dias et al., 2017; Shaver et al., 2020).

O presente plano de trabalho se insere no Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (PMBA) e representa mais uma etapa de execução do tema **Fundos Recifais e Bancos de Rodolitos**. Além de atender a objetivos e metas iniciais, embasadas pelo TTAC, algumas já alcançadas e outras em progresso (dentro do cronograma), o presente plano de trabalho incorpora o conhecimento acumulado nos primeiros anos de execução. Destaca-se o grande volume de novas informações sobre ecossistemas recifais da área de estudo (e.g. Teixeira et al., 2021; Cardoso et al., 2022), bem como as dezenas de publicações recentes sobre os impactos do rompimento da barragem (e.g. Evangelista et al., 2022; Nascimento et al., 2022). O plano de trabalho enfoca os dois ecossistemas mais biodiversos da região marinha afetada pelo rompimento da barragem, ambos construídos por organismos mineralizadores de CaCO_3 , muito sensíveis a mudanças na temperatura, pH, e nos níveis de luz/sedimentação. Apesar da relevância global dos recifes e bancos de rodolitos do norte do ES e sul da BA, bem como da existência de uma rede de áreas protegidas (e.g. APA Costa das Algas, REVIS Santa Cruz, PARNAM Abrolhos, RESEX Cassurubá, APA Ponta da Baleia), as linhas de base sobre as comunidades bênticas da região são limitadas e, em geral, não cobrem o período antecedente ao rompimento da barragem. O próprio mapeamento desses sistemas, que tendem a ser fragmentados, espacialmente heterogêneos e temporalmente dinâmicos, permanece incipiente. Esse contexto reflete a complexidade envolvida na avaliação dos impactos sobre recifes e bancos de rodolitos, que não se restringem ao rompimento da barragem. A região afetada sofre, historicamente, com a sobrepesca e a perda na qualidade da água devido à expansão agrícola, urbana, industrial e minerária na zona costeira (Moura et al., 2013; Teixeira et al., 2021).

As etapas iniciais de execução do projeto envolveram o desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas, métodos e protocolos amostrais que atendessem aos objetivos do projeto, bem como a produção de linhas de base acerca de características físico-químicas, biológicas e ecológicas dos recifes e bancos de rodolitos, no sentido de gerar elementos para subsidiar os contrastes temporais entre áreas afetadas em maior ou menor magnitude. Além disso, foi dada continuidade à aquisição de dados nas áreas menos afetadas do PARNAM dos Abrolhos e adjacências, essenciais para a interpretação dos resultados. As primeiras etapas de execução incluíram o reconhecimento da diversidade de macroalgas e outros grupos de organismos bentônicos recifais, incluindo a construção de “checklists” e tombamento de material em coleções, bem como a elaboração de guias de identificação e descrições de novas espécies. Constatamos possíveis efeitos do rompimento da barragem em espécies (e.g. integridade celular de macroalgas) e comunidades bênticas (e.g. alterações espaço-temporais na estrutura de comunidades), em processos ecológicos característicos dos recifes e bancos de rodolitos (e.g. mineralização de CaCO_3 , recrutamento, fotossíntese), e também na natureza sedimentar do fundo (e.g. mineralogia). Destaca-se as alterações detectadas na estrutura de comunidades de macroalgas na área da APA Costa das Algas/REVIS Santa Cruz, com aumento na

abundância de algas mais tolerantes a metais após o rompimento. Com relação à abrangência espacial da contaminação, detectamos assinaturas geoquímicas do rompimento da barragem em esqueletos corais da região adjacente ao Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (PARNAM) (Cardoso et al., 2022), confirmadas por outras abordagens empregadas pelo PMBA (e.g. Evangelista et al., 2022). A presença de contaminantes, inclusive metais e/ou partículas oriundas do rompimento, em macroalgas, corais e algas coralináceas formadoras de rodolitos, confirmam a hipótese de que os efeitos do evento são de maior magnitude nas áreas recifais mais próximas da foz do rio Doce, mas se estendem até a região adjacente ao PARNAM.

O presente plano de trabalho, baseado em 16 metas associadas a produtos e indicadores, reconhece as etapas vencidas e o conhecimento já consolidado, de forma a otimizar os recursos destinados aos estudos em recifes e bancos de rodolitos no âmbito do PMBA.

3. OBJETIVOS

Os objetivos da próxima etapa de execução do projeto **Fundos Recifais e Bancos de Rodolitos**, em 18 meses, abrangem: **i)** a consolidação da caracterização da estrutura e da dinâmica de comunidades recifais e de bancos de rodolitos, em áreas controle e potencialmente impactadas pelo rompimento da barragem; **ii)** a qualificação e quantificação dos efeitos desse evento em organismos e comunidades recifais alvo do projeto.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Descrever e interpretar a dinâmica das comunidades bênticas a partir de imageamentos do fundo, em parcelas fixas (recifes) e com dropcams (bancos de rodolitos), com estimativas de recobrimento produzidas em até seis meses após cada campanha.

Justificativa: Os imageamentos propostos permitem acessar variações na cobertura dos recifes por diferentes tipos de organismos (e.g. corais, macroalgas, zoantídeos), ou seja, variações no nível de comunidades (e.g. diversidade, dominância, estrutura taxonômica e funcional), as quais podem estar associadas a forçantes naturais (e.g. anomalias climáticas) e antropogênicas (rompimento da barragem, manejo e unidades de conservação) e tendem a se configurar em escalas temporais de anos ou décadas.

META 2 – Complementar a descrição e interpretação da dinâmica das comunidades bênticas a partir de amostragens com fotogrametria, anualmente em quatro recifes contrastantes, com montagem de ortomosaicos em até seis meses após cada campanha e estimativas de cobertura produzidas em até 12 meses após o imageamento.

Justificativa: A fotogrametria cobre parcelas amostrais com dezenas ou centenas de metros quadrados, complementando o imageamento em parcelas fixas e com *dropcams* com um quadro mais representativo da variabilidade das comunidades recifais na escala da paisagem. Os ortomosaicos também permitem detectar mudanças em escalas demográficas (e.g. mortalidade parcial e fragmentação de corais), pouco acessíveis com outras abordagens amostrais.

META 3 – Caracterizar a água sobrejacente aos recifes com fundeios multiparamétricos (~48 h), anualmente em quatro sítios, e perfilagens da coluna d'água, semestralmente em toda a malha.

Justificativa: Os fundeios e perfilagens com diversos sensores eletroquímicos e óticos permitem caracterizar a água adjacente aos recifes e integrar propriedades do pelagial e das comunidades bênticas. Além disso, os dados das perfilagens e fundeios permitem validar a extensa base de dados obtidos continuamente através de sensoriamento remoto. Trata-se de um conjunto de informações imprescindíveis para ampliar a compreensão acerca das forças naturais e antropogênicas que determinam a estrutura e a dinâmica do sistema recifal.

META 4 – Obter e interpretar séries densas de dados de temperatura e luz, com uso de sensores in situ, em oito pontos da malha, com dados interpretados anualmente

Justificativa: Temperatura e luz são variáveis essenciais para a compreensão de variações nas comunidades coralíneas, sendo indispensáveis para a interpretação de variáveis relacionadas à saúde dos corais (e.g. doenças e branqueamento). As séries densas de dados derivados de sensores *in situ* também permitem validar e interpretar dados obtidos por sensoriamento remoto.

META 5 – Analisar e interpretar dados de sedimentos depositados em armadilhas, semestralmente em quatro recifes costeiros, dois recifes offshore e três sítios com bancos de rodolitos, com dados granulométricos e mineralógicos gerados em até seis meses após cada amostragem e interpretados anualmente.

Justificativa: O estudo com armadilhas permite conhecer as oscilações na composição e níveis de deposição de sedimentos, bem como detectar a possível presença de material proveniente da ruptura da barragem. A deposição de sedimentos é um dos processos que mais influencia a dinâmica e a vitalidade das comunidades coralíneas.

META 6 – Compilar e interpretar séries mensais, semestrais e anuais de dados de sensoriamento remoto cobrindo toda a malha do projeto.

Justificativa: O estudo com base em sensoriamento remoto inclui a aquisição de dados de turbidez e temperatura, entre outros, fornecendo uma parcela importante das variáveis explanatórias utilizadas na interpretação das variações observadas nas comunidades bênticas recifais.

META 7 – Modelar, de forma integrada, os dados de cobertura bêntica e de variáveis geográficas (e.g. distância da costa e da foz do Rio Doce), associadas ao manejo (dentro e fora de Unidades de Conservação), sedimentológicas (tipo de sedimento e taxas de deposição) e da água (dados in situ e de sensoriamento remoto), anualmente.

Justificativa: A modelagem integrada é crucial para a compreensão da dinâmica bêntica dos recifes e sua possível interação com as forças naturais e antropogênicas, incluindo o material oriundo da barragem rompida e outros processos decorrentes desse evento.

META 8 – Estimar a produção de CaCO_3 , diversidade e cobertura de organismos em placas artificiais, anualmente em seis sítios contrastantes.

Justificativa: A produção de CaCO_3 é um dos processos mais importantes nos ecossistemas recifais e pode ser utilizada como *proxy* da influência de forças naturais e antropogênicas, além de prover informações essenciais para o planejamento espacial e restauração desses sistemas recifais (e.g. identificar áreas com diferentes níveis de recrutamento de corais e seus indutores).

META 9 – Estimar concentrações de pigmentos clorofilianos e carotenoides em três espécies de corais, semestralmente para três recifes contrastantes, com dados interpretados anualmente.

Justificativa: O teor de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas) e fotoprotetores (carotenoides) são indicadores do estado fisiológico dos endossimbiontes de corais e respondem a condições do ambiente (e.g. transparência, contaminantes). Este conjunto de indicadores permite acessar efeitos subletais de estressores relacionados ou não ao rompimento, bem como subsidiar ações de restauração.

META 10 – Obter amostras de matéria orgânica particulada (MOP), corais, outros invertebrados e macroalgas recifais, nas quatro áreas amostrais, disponibilizando esse material para análises de concentração de metais, a serem feitas pelo grupo de hidrogeoquímica, semestralmente, com dados interpretados anualmente

Justificativa: O grupo de hidrogeoquímica do PMBA está produzindo um panorama abrangente de concentração de metais em organismos aquáticos e a entrada de materiais provenientes de ambientes

recifais e bancos de rodolitos irá ampliar o quadro acerca da contaminação no ambiente marinho.

META 11 – Medir parâmetros fotossintéticos em três espécies de corais, semestralmente para três recifes contrastantes, com dados interpretados anualmente

Justificativa: Os parâmetros fotossintéticos são bons indicadores do funcionamento dos fotossistemas dos endossimbiontes e, portanto, da saúde de corais.

META 12 – Estimar a densidade e caracterizar a morfologia (tamanho e volume) de fotoendossimbiontes em três espécies de corais, semestralmente para três recifes contrastantes, com dados interpretados anualmente.

Justificativa: O teor de pigmentos, a quantidade de células de endossimbiontes por unidade de área dos corais, bem como seu tamanho e biovolume, servem como indicadores da saúde do coral, refletindo alterações no meio circundante. Esses indicadores serão utilizados tanto no monitoramento dos recifes quanto na avaliação da saúde de colônias transplantadas.

META 13 – Estimar a diversidade genética de fotoendossimbiontes (zooxantelas) e microbiota procarionte, semestralmente em três recifes contrastantes, anualmente em três recifes contrastantes, para até três espécies de corais, com interpretação anual dos dados.

Justificativa: O sequenciamento gênico é a forma mais eficiente para acessar a diversidade de microrganismos associados a corais. Os fotoendossimbiontes (Symbiodiniaceae) e a microbiota procarionte (bactérias e cianobactérias) têm papel crucial na fisiologia e saúde dos corais e abrange táxons com distintos níveis de sensibilidade ao ambiente. Trata-se de um componente importante na avaliação dos efeitos do rompimento e de outras forças na saúde dos corais, bem como para subsidiar ações de restauração e manejo.

META 14 – Modelar, de forma integrada, dados de saúde e diversidade de fotoendossimbiontes de corais e variáveis da d'água, anualmente.

Justificativa: A modelagem multivariada permite entender a magnitude do efeito de diferentes gradientes ambientais sobre a diversidade de simbiontes e sobre a saúde dos corais, inclusive efeitos que possam estar relacionados ao rompimento.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Cobertura percentual de todos os organismos amostrados com fotoquadrados nas	Rodrigo L. Moura

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
parcelas fixas em recifes coralíneos, semestralmente; - Cobertura percentual de percentual de todos os organismos amostrados com <i>dropcams</i> em bancos de rodolitos, semestralmente; - Cobertura percentual dos recifes amostrados com fotogrametria e com <i>dropcams</i> (bancos de rodolitos), anualmente;	
- Variáveis da água adjacente aos recifes e bancos de rodolitos em fundeios multiparamétricos, incluindo, condutividade, temperatura, profundidade, clorofila, oxigênio dissolvido, CDOM, CO ₂ e irradiância (PAR), semestral; - Variáveis da água em perfilagens verticais, incluindo condutividade, temperatura, concentração de clorofila e irradiância (PAR), semestralmente;	Paulo S. Salomon
- Dados de temperatura e luz obtidos com sensores <i>in situ</i> , semestralmente;	Rodrigo L. Moura
- Dados volumétricos, granulométricos e mineralógicos dos sedimentos depositados em armadilhas, semestralmente;	Leonardo T. Salgado
- Shape files com valores obtidos de sensoriamento remoto, incluindo temperatura do mar, turbidez e clorofila, mensal e semestral;	Rodrigo L. Moura
- Estimativa de produção de CaCO ₃ e abundância de organismos assentados em placas artificiais, anualmente;	Rodrigo L. Moura
- Descrição, identificação e dados de campo das amostras de MOP, corais, outros invertebrados e macroalgas recifais coletadas, acondicionadas e transferidas para o grupo de geoquímica do PMBA, na UFES, para análises de concentrações de metais, semestralmente;	Rodrigo L. Moura
- Concentrações de pigmentos clorofilianos, carotenóides e lipídeos por unidade de área de corais, semestralmente;	Paulo S. Salomon
- Parâmetros fotossintéticos (Fv/Fm, YII) de corais, semestralmente;	Paulo S. Salomon
- Densidade por unidade de área, tamanho e biovolume de fotoendosimbiontes de corais, semestralmente;	Paulo S. Salomon
- Diversidade genética de fotoendosimbiontes (zooxantelas), anualmente;	Paulo S. Salomon
- Sobrevivência e crescimento de corais transplantados; - Parâmetros fotossintéticos (ETR, FV/FM) e fisiológicos (consumo de O ₂) de corais transplantados, semestralmente;	Rodrigo L. Moura

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Modelos multivariados representando relações entre a variação na estrutura taxonômica e funcional dos recifes (cobertura benthica) e as variáveis geográficas (e.g. distância da costa e da foz do R. Doce), associadas ao manejo (dentro e fora de UCs), sedimentológicas (tipo de sedimento e taxas de deposição) e da água (dados <i>in situ</i> e de sensoriamento remoto).	Lelis A. Carlos Jr
- Modelos multivariados representando relações entre a variação na estrutura taxonômica e funcional dos bancos de rodolitos (cobertura benthica, tamanho e forma dos nódulos) e variáveis geográficas (e.g. distância da costa e da foz do R. Doce), associadas ao manejo (dentro e fora de UCs), sedimentológicas (tipo de sedimento e taxas de deposição) e da água (dados <i>in situ</i> e de sens. remoto).	Lelis A. Carlos Jr
- Estimativas de cobertura dos recifes com base nos ortomosaicos, incluindo contrastes espaciais e temporais.	Rodrigo L. Moura
- Modelos multivariados representando possíveis relações entre parâmetros morfológicos e fisiológicos dos simbiontes e variáveis geográficas (e.g. distância da costa e da foz do R. Doce) e da água (dados <i>in situ</i> e de sens. remoto).	Paulo S. Salomon
- Representação e interpretação das séries densas de dados <i>in situ</i> de temperatura e luz.	Rodrigo L. Moura
- Análises multivariadas da variação espaço-temporal nos dados volumétricos, granulométricos e mineralógicos dos sedimentos depositados em armadilhas.	Lelis A. Carlos Jr
- Visualizações, em ambiente SIG, das séries mensais, semestrais e anuais de dados de sensoriamento remoto.	Rodrigo L. Moura
- Análises univariadas explorando a variação espaço-temporal na produção de CaCO ₃ em placas de colonização.	Rodrigo L. Moura
- Análises multivariadas explorando a variação espaço-temporal na cobertura das placas de colonização.	Rodrigo L. Moura
- Análises uni e multivariadas representando as concentrações de metais na MOP, corais, outros invertebrados e macroalgas recifais.	Rodrigo L. Moura

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Contrastes espaciais, temporais e taxonômicos da saúde de corais.	Paulo S. Salomon
- Análises bioinformáticas da diversidade de zooxantelas.	Paulo S. Salomon

6. METODOLOGIA

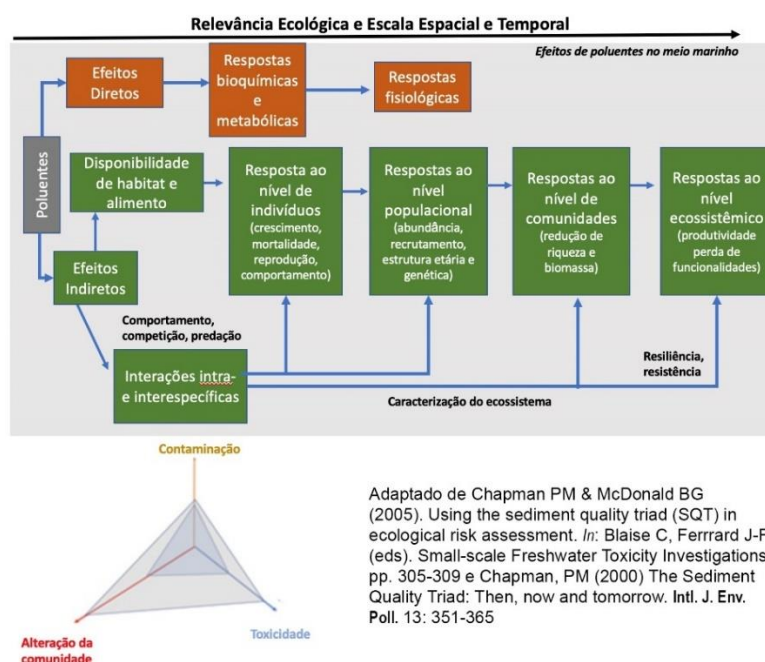
6.1. Malha e frequência amostral (Malha e periodicidade)

O monitoramento contempla amostragens semestrais em fundos recifais e bancos de rodolitos, com acesso realizado principalmente através de campanhas embarcadas e, secundariamente, a partir da linha de costa e com acesso rodoviário (recifes costeiros da APA Costa das Algas/REVIS). A malha, inicialmente baseada nos pontos pré-estabelecidos no TR, foi adaptada a partir de reuniões e workshops FEST/RRDM/CTBio, e está apresentada na Figura 12.

6.2. Racional

O projeto gera informações ao nível de organismos (e.g. corais e simbiossiontes), comunidades (e.g. plâncton e cobertura benthica) e processos ecológicos (e.g. biomineralização), as quais são interpretadas à luz dos indutores físico-químicos e geo-hidrológicos, associados ou não ao rompimento da barragem. Efeitos observáveis ao nível dos organismos podem ser diretos e quase instantâneos (e.g. contaminação por metais, resposta do aparato fotossintético à turbidez), mas também podem se configurar indiretamente e ao longo de meses ou anos (e.g. comprometimento da saúde, fecundidade, mortalidade), na forma de efeitos crônicos (Figura 11). Além disso, processos que operam ao nível de comunidades e populações tendem a se configurar em escalas temporais entre meses e décadas (e.g. cobertura dos recifes) (Figura 11), e podem se propagar de maneira fragmentada e com hiatos temporais.

Figura 11: Efeitos diretos e indiretos da poluição nos diferentes níveis organizacionais dos ecossistemas marinhos. Assim como a complexidade do sistema, a relevância ecológica dos efeitos aumenta na direção das maiores escalas espaciais e temporais.



6.3. Delineamento amostral

Considerando a natureza multi-escalar e multidimensional dos processos enfocados, bem como as dificuldades na reconstrução de “baselines” e execução de experimentos manipulativos adequadamente replicados, a avaliação do impacto depende de monitoramentos que permitam estimar: i) o estado do sistema na ausência e presença do estressor, e ii) incertezas associadas às diferenças entre essas estimativas (Stewart-Oaten, 1996). Para isso, as amostragens devem transcender os sítios sob a pluma de contaminantes. Além disso, as expectativas de resposta (hipóteses alternativas) podem ser diferentes de uma atenuação linear. Ou seja, mesmo após a melhoria das condições na bacia hidrográfica, a atenuação da contaminação costeiro-marinha pode ocorrer de forma não-linear, em escalas temporais dilatadas e com “lags”, estando sujeita a variação estocástica e hidroclimatológica.

Separar a variabilidade natural dos efeitos do rompimento da barragem envolve a combinação de diferentes abordagens. Delineamentos do tipo Controle-Impacto (“Control-Impact”), com comparações entre sítios afastados e próximos da fonte de impacto, podem violar a premissa de que áreas controle e impactadas seriam idênticas e teriam se comportado da mesma forma na ausência do impacto. A despeito dessa limitação, o monitoramento ao longo de um gradiente de atenuação (i.e., a partir da foz do Rio Doce) pode se apresentar como alternativa. Delineamentos do tipo Antes-Depois (“Before-After”) possuem limitações inerentes às linhas de base, as quais, no caso dos recifes e rodolitos, são concentradas em áreas mais afastadas da foz do Rio Doce. Delineamentos do tipo Antes-Depois-Controle-Impacto (“Before-After-Control-Impact”) combinam essas abordagens e buscam separar os efeitos do estressor de outras fontes de variabilidade (Green, 1979), a partir da identificação de interações entre tempo e local. Embora sejam delineamentos robustos, pode ocorrer confusão entre efeitos dos estressores e flutuações locais (interações tempo*local). Diante desse contexto, usamos um consórcio de abordagens que também incluem séries temporais mais longas (“Before-After-Control-Impact Paired Series”) e controles múltiplos (“beyond-BACI”) (Underwood, 1991; 1992; Stewart-Oaten, 1996).

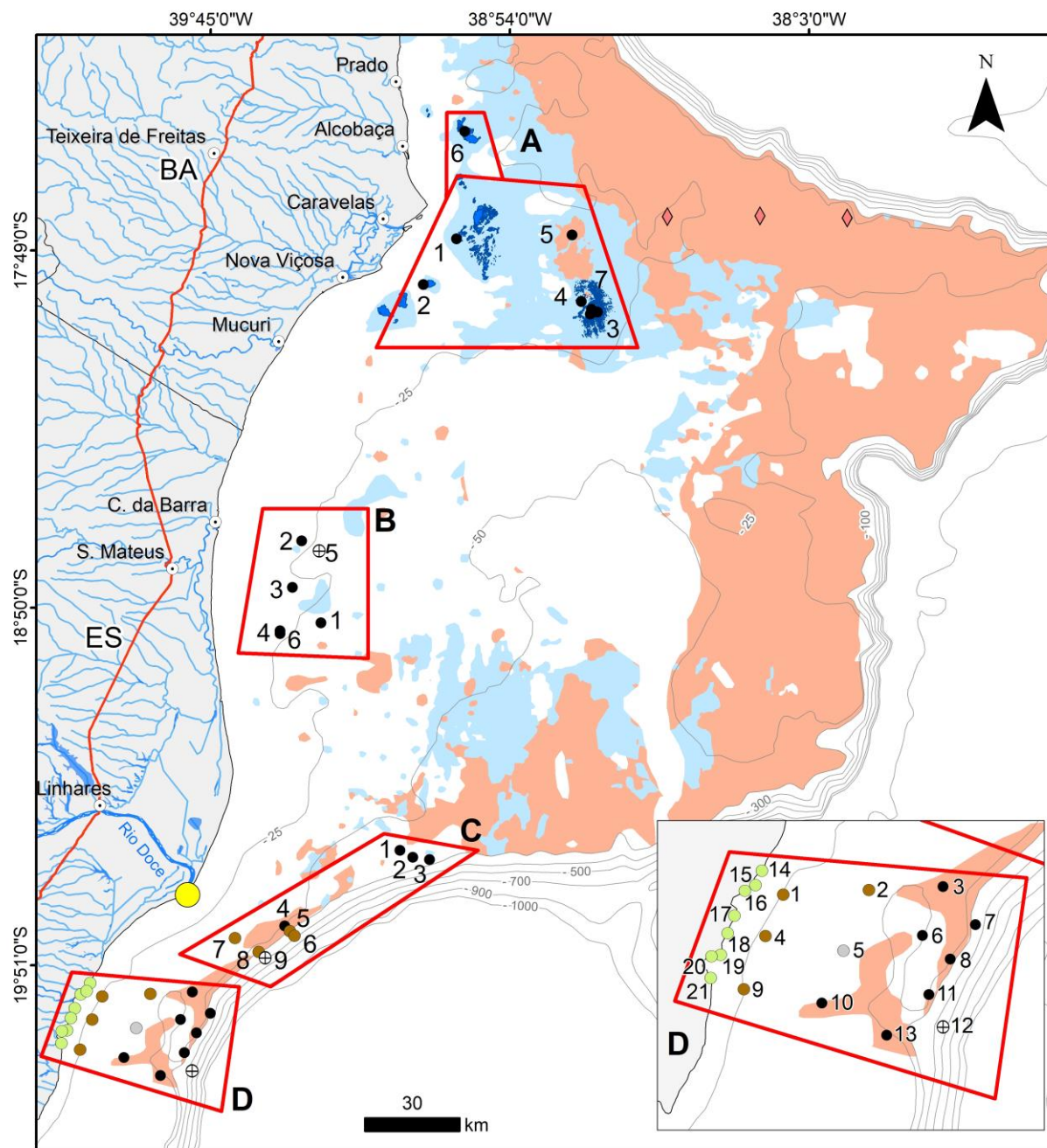
Mais do que aceitar ou rejeitar a hipótese nula de que não houve impacto sobre recifes e bancos de rodolitos (a chamada “cultura do p-valor”), nossa perspectiva é estimar a extensão e magnitude dos impactos e apresentar informações consistentes acerca dos organismos recifais e da estrutura e da dinâmica das comunidades de recifes e bancos de rodolitos, no sentido de balizar tomada de decisões sobre recuperação, mitigação e compensação de danos irreparáveis.

6.4. Abordagens analíticas

Os conjuntos de dados brutos, inseridos inicialmente em planilhas Excel, são codificados e formatados com uso do software livre R (R Core Development Team, 2018) e softwares comerciais (e.g. Clarke & Warwick, 2001), passando por procedimentos de controle de qualidade. Os pacotes utilizados incluem Dplyr, Psych e tidyverse, ggplot2 e GGally para compor visualizações, e pca, FactoMineR, factoextra para análises multivariadas, com emprego da biblioteca ggbiplot para visualização. A maior parte dos dados possui estrutura com alta dimensionalidade, dado o grande número de variáveis exploradas

simultaneamente, demandando técnicas multivariadas de ordenação e modelagem. Essa abordagem visa descobrir padrões em dimensões reduzidas e inclui Análise de Componentes Principais (PCA), Escalonamento Multidimensional (MDS), modelos lineares (LM) e não lineares (GLM), e análises de redundância baseadas em distâncias (e.g. DISTLM e dbRDA), entre outras. Nas análises de PCA, novas componentes de dimensão reduzida são criadas com base em projeções ortogonais, minimizando a variação residual e maximizando a variabilidade explicada. O MDS foca na preservação da ordem das dissimilaridades para uma escolha de dimensões previamente definidas (Clarke & Warwick, 2001). Os modelos lineares e não-lineares buscam representar a relação entre variáveis preditoras (e.g. variáveis ambientais) e variável(is) resposta (e.g. cobertura de corais). Os Modelos Lineares Baseados em Distâncias (DISTLM) modelam a regressão linear multivariada e se baseiam em uma matriz de similaridades e um procedimento de permutação que atenua premissas de normalidade (Legendre & Anderson, 1999). A Análise de Redundância Baseada em Distâncias (dbRDA) é uma técnica de redução de dimensões com restrições, baseada nos resultados do DISTLM, fornecendo um panorama das variáveis a reduzir e das covariáveis (variáveis ambientais) (Legendre & Anderson, 1999). Em caráter complementar, utilizamos análises de agrupamento ("cluster"), com medidas de similaridade e algoritmos de agrupamento hierárquico (aglomerativos ou divisivos), bem como análises de similaridade de porcentagens (SIMPER) com objetivo de identificar táxons com maior contribuição na diferenciação entre grupos de amostras.

Figura 12: Mapa da região de estudo com discriminação das quatro áreas amostrais (A= PARNAM Abrolhos e Adjacência, B- Recifes Esquecidos, C-Foz, D-APA Costa das Algas/REVIS) e pontos da malha amostral. Medição das Variáveis e Replicação



Legenda

● PMBA	● Recifes costeiros	■ Recifes emergentes	A - Abrolhos
● Fundos Recifais	⊕ Sem informação	■ Recifes submergentes	B - Recifes Esquecidos
◆ Rodolitos Norte	● Rodolitos mortos	■ Bancos de rodolitos	C - Foz Rio Doce
● Foz Rio Doce	● Ausência de rodolitos	■ Áreas de estudo	D - Costa das Algas

Cobertura bântica: A cobertura dos recifes é estimada com base em fotoquadrados (0,7 m²) amostrados semestralmente em parcelas fixas (20 por sítio) demarcadas por vergalhões fixados ao recife (Teixeira et al., 2021), bem como a partir de ortomosaicos construídos com técnicas de fotogrametria e cobrindo dezenas ou centenas de m² (e.g. Urbina-Barreto I. et al., 2021; Yuval M. et al., 2021) em sítios representativos da malha. A estimativa da cobertura dos bancos de rodolitos é baseada em lançamentos de dropcams (5-10 por estação amostral) (Holz et al., 2020). Nos sítios nos recifes adjacentes ao litoral, na APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz, os fotoquadrados são dispostos aleatoriamente, uma vez que não é desejável fixar vergalhões nesse ambiente. Os dados quantitativos derivados dessas três abordagens baseadas no imageamento do fundo são extraídos com a plataforma CoralNet (coralnet.ucsd.edu), a qual permite automatizar identificações com diferentes níveis de supervisão. O sistema utiliza um algoritmo de “machine learning” que reconhece padrões de cor e textura das imagens (Beijbom et al., 2015), processadas usando 50 pontos aleatoriamente distribuídos.

Variáveis físico-químicas da água: Em cada estação é realizada perfilagem vertical com CTD para obtenção de salinidade, temperatura, concentração de clorofila e irradiância (PAR). Em estações representativas são feitas medidas contínuas (fundeios) de 24h abrangendo pelo menos um ciclo de marés com uma sonda multiparamétrica Seaguard (Aanderaa) com sensores para temperatura, salinidade, clorofila, turbidez, pH, CDOM e oxigênio dissolvido. Os dados físico-químicos são descarregados e checados a bordo, com pré-processamento no software AADI Real Time Collector e Data Studio. O processamento dos dados é feito na plataforma Ocean Data View (<https://odv.awi.de>). Dataloggers de registro contínuo de temperatura e luz *in situ* (HOBO) são mantidos em subsuperfície (5-15 m de profundidade), em pontos representativos da malha, registrando a temperatura a cada 3 h. A intensidade da luz é estimada em LUX, usando os dados dos primeiros 10 dias após a instalação. A extração dos dados é feita com o software Hoboware.

Sensoriamento remoto. Na escala regional, são obtidos dados de atenuação da luz (turbidez), temperatura superficial do mar (SST), clorofila a (Chla) e radiação fotossinteticamente ativa (iPAR). A extração, processamento e exploração dessas variáveis é feita em ambiente R, integrado a um Sistema de Informação Geográfica (SIG). Os produtos processados são derivados do sensor MODIS (MODerate Resolution Imaging Spectroradiometer), acoplado ao satélite Aqua e disponíveis em repositórios da NOAA com resolução temporal de dois dias e resolução espacial de 4 km. Os valores de K490 (Coeficiente de Atenuação Difusa, 490nm), Chla e iPAR são obtidos no ERDDAP (Easier Access to Scientific Data), com dados calibrados pelo Ocean Biology Processing Group (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>), ao passo que valores de SST (4m, noturno) são adquiridos na PODAAC (Physical Oceanography Distributed Active Archive Center).

Sedimentos: Além dos sedimentos retidos nas armadilhas dispostas em triplicatas em pontos representativos da malha (Figura 12), são coletados 3 tubos com sedimento superficial em cada estação (~100 g). O volume de sedimentos retidos armadilhas é quantificado e contrastado, fornecendo uma estimativa de taxas de deposição. O material coletado nas armadilhas e tubos é seco por liofilização (48 h) e passado por baterias de peneiras em agitador eletromagnético. Os sedimentos são classificados com base na escala granulométrica de fragmentos clásticos de Wentworth e a mineralogia

é determinada através de difração de raios X, usando um *PANalytical X' Pert Pro Multipurpose Powder Diffractometer*. A identificação das fases cristalinas é feita no software *Panalytical X' Pert Pro V3*, com comparação com dados da *Crystallographic Open Database*. A quantificação de fases cristalinas é baseada na técnica de refinamento Rietveld, com uso do software MAUD (Titschack et al., 2011).

Produção de CaCO_3 e organismos assentados em placas artificiais. A produção de CaCO_3 é estimada anualmente com uso de “Calcification Accretion Units (CAUs)”, unidades amostrais padronizadas que vem sendo usadas, globalmente, para quantificar a acreção líquida de CaCO_3 e o recrutamento de organismos bentônicos (Johnson et al., 2022), inclusive na região de estudo (Reis et al., 2016). As CAUS, em triplicata, juntamente com placas de terracota (complementares, em algumas estações), são instaladas em pontos representativos da malha, cobrindo fundos de rodolitos e áreas recifais (Figura 12). O processamento das placas é padronizado (Johnson et al., 2022) e inclui lavagem em hidróxido de cálcio em água deionizada (pH 10) para evitar desmineralização, secagem e obtenção da massa total (calcária e não calcária). O material é calcinado para estimar a massa orgânica através da subtração da massa total da massa calcinada. O restante do material é submerso em solução de HNO_3 para dissolução do CaCO_3 e obtenção da massa carbonática pela subtração da massa calcinada da massa de cinzas. A massa carbonática é normalizada em função da área da CAU e do tempo de colonização (t), resultando numa taxa de acúmulo líquido de CaCO_3 ($\text{g.cm}^{-2}.\text{t}^{-1}$). A colonização é estimada a partir de imagens tomadas das placas logo após a sua recuperação, as quais são analisadas conforme o protocolo de imageamento bêntico.

Saúde de corais: Acessada através de um conjunto de variáveis, abaixo discriminadas, com base em amostragens feitas em pontos representativos da malha e abrangendo três espécies de corais (*Montastraea cavernosa*, *Mussismillia brasiliensis* e *M. harttii*). A remoção do tecido dos corais é feita a bordo com jato de ar comprimido, em uma superfície do coral registrada por imagens no sentido de permitir normalizações por área. A suspensão é homogeneizada, aliquotada em criotubos e congelada em N-líquido (pigmentos, carotenoides e lipídios, caracterização genética) ou fixada em paraformaldeído (quantificação e análise morfológica de zooxantelas).

i) Concentração de pigmentos clorofilianos e carotenoides. A extração dos pigmentos é realizada em acetona 90%, após filtragem (GF/F). As fluorescências dos extratos são medidas em espectrofluorímetro *VARIAN* (CARY ECLIPSE) e as concentrações de clorofilas e feofitinas são calculadas segundo o protocolo adaptado por Vanzan et al. (2015). A concentração de carotenóides totais é feita em espectrofotômetro (Parsons et al., 1984).

ii) Densidade e morfologia de fotoendosimbiontes (zooxantelas). As suspensões em paraformaldeído, usadas para acessar a densidade e morfologia de fotoendosimbiontes, são homogeneizadas e sonicadas, filtradas ($45\mu\text{m}$) e analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica (Cytotflex, Beckman-Coulter), com adição de controles internos. As análises morfométricas e estimativas de biovolume de zooxantelas são feitas em sistema de imageamento em fluxo (*FlowCam® model VS, Fluid Imaging Technologies*).

iii) Diversidade genética. A identidade das zooxantelas é acessada com base na região nuclear

do espaçador interno 2 dos transcritos do DNA ribossomal (ITS2) (Stat et al., 2011; Quigley et al., 2016), ao passo que a comunidade microbiana é acessada com o marcador 16SrDNA (Klindworth et al., 2013). As sequências são obtidas na plataforma MiSeq Illumina, seguindo protocolo adaptado por Alanagreh et al. (2017). Os dados brutos são tratados no software MOTHUR (Schloss et al., 2009) e a identificação é baseada em bancos de dados (e.g. Symportal para Symbiodiniaceae e ARB-Silva para procariontes). São realizadas análises filogenéticas para validação taxonômica (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e calculados índices de diversidade, desequilíbrio de ligação entre loci, frequências de genótipos, e estruturação populacional.

iv) Parâmetros fotossintéticos. A condição fisiológica de corais é avaliada *in situ* por fluorometria de pulso modulado (Ralph & Gademann, 2005) usando um Diving-PAM I (blue light). A abordagem permite acessar a atividade fotossintética dos endossimbiontes, estimar a eficiência do fotosistema II (PSII), descrever o estado de seu aparato fotossintético, e fazer inferências sobre o regime de luz recente. Os dados extraídos do fluorímetro são processados com o software WinControl (WALZ, Germany) e analisados de acordo com Ralph & Gademann (2005).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alanagreh L, Pegg C, Harikumar A, Buchheim M. (2017). Assessing intragenomic variation of the internal transcribed spacer two: Adapting the Illumina metagenomics protocol. **PLOS ONE** 18;12(7): e0181491.
- Andrades, R. et al. (2020) Early evidences of niche shifts in estuarine fishes following one of the world's largest mining dam disasters. **Marine Pollution Bull.** 154.
- Andrades R. et al. (2022) Effects of seasonal contaminant remobilization on the community trophic dynamics in a Brazilian tropical estuary. **Science of the Total Environment** 801: 149670.
- Beijbom, O. et al. (2015) Towards automated annotation of benthic survey images: Variability of human experts and operational modes of automation. **PLOS ONE** 10.7: e0130312.
- Cardoso G.O. et al. (2022) Coral growth bands recorded trace elements associated with the Fundão dam collapse. **Science of the Total Environment** 807(2): 150880.
- Clarke, K. & Gorley, R. (2015) **Getting started with PRIMER v7**. PRIMER-E Ltd, 300p.
- Clarke, K. & Warwick, R. (1994) **Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation**. PRIMER-E Ltd.
- Costa P.G. et al (2022) Temporal and spatial variations in metals and arsenic contamination in water, sediment and biota of freshwater, marine and coastal environments after the Fundão dam failure. **Science of the Total Environment** 806(3): 151340.
- Evangelista H. et al. (2022) Using NdSr isotopes in suspended sediments in the Abrolhos coral-reef

(SW Atlantic, Brazil) to assess potential contamination from the 2015 Fundão dam collapse. **Science of the Total Environment** 807(2): 151231.

Francini-Filho R.B. et al. (2019) Remote sensing, isotopic composition and metagenomics analyses revealed Doce River ore plume reached the southern Abrolhos Bank Reefs. **Science of the Total Environment** 697: 134038.

Green, R.H. (1979) **Sampling design and statistical methods for environmental biologists**. John Wiley & Sons.

Hatje V. et al. (2017) The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports** 7: 10706.

Holz, V. et al. (2020) Structure of rhodolith beds and surrounding habitats at the Doce river shelf (Brazil). **Diversity** 12(2): 75.

Johnson, M.D., Price, N. N. & Smith, J.E. (2022). Calcification accretion units (CAUs): A standardized approach for quantifying recruitment and calcium carbonate accretion in marine habitats. **Methods in Ecology and Evolution**. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13867>

Klindworth A. et al. (2017). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Res.** 741(1):e1.

Magris R.A., Marta-Almeida M., Monteiro J.A.F., Ban N.C. (2019) A modelling approach to assess the impact of land mining on marine biodiversity: Assessment in coastal catchments experiencing catastrophic events (SW Brazil). **Science of the Total Environment** 659: 828-840.

Marangoni L.F.B. et al. (2017) Effects of CO₂-driven acidification of seawater on the calcification process in the calcareous hydrozoan *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758). **Coral Reefs** 36: 1133–1141.

Martinez A. et al. (2019) Species-specific calcification response of Caribbean corals after 2-year transplantation to a low aragonite saturation submarine spring. **Proc. Royal Soc. B** 286: 20190572.

Moura R.L. et al. (2013) Spatial patterns of benthic megahabitats and conservation planning in the Abrolhos Bank. **Continental Shelf Res.** 70: 109-117.

Nascimento R.L. et al. (2022) The Fundão dam failure: Iron ore tailing impact on marine benthic macrofauna. **Science of the Total Environment** 838(3): 156205.

Parsons, T.R. et al. (1984) Determination of chlorophylls and total carotenoids: Spectrophotometric method. In: A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Oxford: Pergamon Press Ltd, pp. 101-104.

Quigley K.M., Willis B.L., Bay L.K. (2016). Maternal effects and *Symbiodinium* community composition drive differential patterns in juvenile survival in the coral *Acropora tenuis*. **Royal Society Open Science** 3(10): 160471.

Ralph, P.J. & Gademann, R (2005) Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquat. Bot.** 82:222–237.

R Core Team (2018) **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>.

Reis, V. M. et al. (2016) Carbonate Production by Benthic Communities on Shallow Coralgal Reefs of Abrolhos Bank, Brazil. **PLOS ONE** 11(4).

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19(12):1572-4.

Schloss, P.D. et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(23):7537-41.

Segura F.R. et al. (2016) Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution** 218: 813-825.

Shaver E.C. et al (2020) A manager's guide to coral reef restoration planning and design. **NOAA Technical Memorandum** CRCP 36.

Silva-Dias A.M., Fonseca A., Paglia A.P. (2017) Biodiversity monitoring in the environmental impact assessment of mining projects: A (persistent) waste of time and money? **Perspectives in Ecology and Conservation** 15: 206-208.

Stat M. et al. (2011). Variation in *Symbiodinium* ITS2 sequence assemblages among coral colonies. **PLOS ONE** 6(1): e15854.

Stewart-Oaten, A. (1996) Goals in environmental monitoring. In: (Ed.). Detecting ecological impacts: Concepts and Applications in Coastal Habitats: Elsevier, chap. 2, pp.17-27.

Teixeira C.D. et al. (2021) Decadal (2006-2018) dynamics of Southwestern Atlantic's largest turbid zone reefs. **PLOS ONE** 16(2): e0247111.

Tisthammer K.H. et al. (2021) Physiological and molecular responses of lobe coral indicate nearshore adaptations to anthropogenic stressors. **Scientific Reports** 11: 3423.

Titschack, J.R. et al. (2011). Magnesium quantification in calcites [(Ca, Mg) CO₃] by Rietveld-based XRD analysis: revisiting a well-established method. **American Mineralogist** 96(7): 1028-1038.

Underwood, A.J. (1991) Beyond BACI: Experimental designs for detecting human environmental impacts on temporal variations in natural populations. **Mar. Freshw. Res.** 42(5): 69-587.

Underwood, A.J. (1992) Beyond BACI: the detection of environmental impacts on populations in the real, but variable, world. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 161: 145-178.

Urbina-Barreto I. et al. (2021) Quantifying the shelter capacity of coral reefs using photogrammetric 3D modeling: From colonies to reefscapes. **Ecological Indicators** 121: 107151.

Vanzan M. et al. (2015) Picoplankton and nanoplankton variability in an Antarctic shallow coastal zone (Admiralty Bay) during the austral summer of 2010/2011. **Polar Biol.** 38:1-18.

Yuval M. et al. (2021) Repeatable semantic reef-mapping through photogrammetry and label-augmentation. **Remote Sensing** 13(4): 659.

PEIXES E CRUSTÁCEOS MARINHOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Maurício Hostim Silva	Coordenador	CEUNES/UFES
Julien Chiquieri	Pesquisador Responsável	CEUNES/UFES
Juliana Castro Monteiro Pirovani	Pesquisador Responsável	CEUNES/UFES
Ana Paula Cazerta Farro	Pesquisador Responsável	CEUNES/UFES
Jean-Christophe Joyeux	Pesquisador Responsável	UFES campus Goiabeiras
Felippe Alexandre Lisboa de Miranda Daros	Pesquisador Responsável	UNESP Registro
Fabiana Cézar Félix Hackradt	Pesquisador Responsável	UFSB
Carlos Werner Hackradt	Pesquisador Responsável	UFSB

2. ESCOPO

Este estudo contemplará os produtos previstos para o Monitoramento do tema Peixes e Crustáceos Marinhos (2022-2024). Desta forma, serão coletados dados biológicos para os estudos da ictiofauna e carcinofauna estuarina/costeira, atingidos direta e indiretamente em consequência da ruptura da barragem de Fundão (Mariana/MG), visando detectar os efeitos dos rejeitos de minério sobre estas comunidades. Os resultados descreverão as variações espaciais e temporais das comunidades de peixes e crustáceos, além de suas relações com as variáveis ambientais após o desastre. Serão analisados organismos coletados na região diretamente impactada pelo rejeito oriundo do rompimento da Barragem de Fundão, quanto da região adjacente (indiretamente impactada). Visando determinar o espectro da biota atingida indiretamente pelo impacto, serão analisados os organismos capturados nos estuários dos rios Piraquê-Açu e São Mateus (norte do Espírito Santo), além de suas áreas marinhas adjacentes. Alguns dos pontos monitorados serão mantidos e acrescentados pontos já estudados pelo grupo de hidrogeoquímica/sedimentologia, para avaliação direta dos seus efeitos nas comunidades de peixes e crustáceos. Os recifes situados na APA Costa das Algas (sul do Espírito Santo) e Abrolhos serão monitorados através de censos visuais. As populações de peixes e crustáceos monitoradas ao longo projeto, sendo descritas quanto a ocorrência, abundância, biomassa, tamanho médio e genética; enquanto as respectivas comunidades serão descritas através de riqueza de espécies, dominância e diversidade. As populações de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos de importância comercial e ecológica, terão seus aspectos reprodutivos monitorados, tais como: período reprodutivo, tamanho mínimo de primeira maturação e fecundidade. A diversidade genética dos organismos será estimada, assim como a determinação da frequência e número de alelos efetivos e privados, heterozigosidade observada e esperada para as espécies selecionadas após o primeiro ano de monitoramento na região no Rio Doce (macroescala) e estuários adjacentes. Além disso, serão realizados estudos genéticos envolvendo DNA mitocondrial (*Barcoding*) para as espécies de peixes e crustáceos coletadas, visando a

composição de um banco de DNA das espécies da região. Relações entre a ecologia trófica da ictiofauna estuarina/marinha serão investigadas, através de análises de conteúdo estomacal e de isótopos estáveis. Finalmente, os padrões de uso de hábitat e conectividade, das espécies de peixes selecionadas, serão determinados através do uso telemetria acústica (ativa e passiva), análises de microquímica de otólitos e fluxo de larvas/recrutas e adultos/juvenis entre os estuários e ambientes costeiros adjacentes.

3. OBJETIVO

Determinar os efeitos do rejeito de minério sobre aspectos das comunidades (composição taxonômica, riqueza de espécies, abundância e biomassa) e das populações (abundância, biomassa, tamanho, ecologia trófica, ecologia reprodutiva, uso do habitat e genética) de peixes e crustáceos estuarinos/costeiros (incluindo peixes recifais) afetados pelo rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG), a partir de uma abordagem espacial e temporal.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 - Comunidades e Populações de Peixes Estuarinos

Submeta 1.1 – Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos

Serão descritos ocorrência, abundância, biomassa e tamanho dos indivíduos, além de calculados os descritores ecológicos da ictiofauna (riqueza, diversidade e dominância). Visando a detecção de impacto nas áreas estudadas, as amostragens para avaliação da distribuição espacial de abundância e biomassa, frequência de ocorrência e riqueza serão realizadas em alguns pontos estudados pelo grupo de hidrogeoquímica/sedimentologia. Dessa forma, pretende-se:

- realizar coletas padronizadas de peixes em três estuários, através de 07 expedições em cada estuário (áreas externa e interna) totalizando 18 meses;
- processar os peixes coletados nas 07 expedições;
- digitar os dados coletados e processados nas 07 expedições;
- analisar variações espaciais e temporais nas assembleias de peixes de cada estuário, comparando as áreas diretamente e indiretamente impactadas, visando detectar possíveis mudanças nos indicadores da comunidade e na estrutura populacional.

Submeta 1.2 – Coletas para estudos dirigidos de ecologia reprodutiva de espécies de peixes de

importância comercial e/ou ecológica

Serão coletados exemplares de peixes estuarinos/marinhos para os estudos dos aspectos reprodutivos de espécies de peixes selecionadas, de acordo com a importância comercial e/ou ecológica e frequência de ocorrência. As espécies estudadas terão seus períodos reprodutivos, fecundidade, proporção sexual e fator de condição determinados. Dessa forma, pretende-se:

- coletas exaustivas de peixes para obtenção de gônadas e dados biométricos;
- fixação das gônadas em campo, conforme protocolos específicos.

META 2 - Comunidades e populações de crustáceos estuarinos

Submeta 2.1 – Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de crustáceos estuarinos/marinhos

Serão descritos ocorrência, abundância, biomassa e tamanho dos indivíduos, além de calculados os descritores ecológicos da carcinofauna (riqueza, diversidade e dominância). Visando detecção de impacto nas áreas estudadas, as amostragens para avaliação da distribuição espacial de abundância (numérica e biomassa), frequência de ocorrência e riqueza serão realizadas em alguns pontos estudados pelo grupo de hidrogeoquímica/sedimentologia. Para cada estuário, serão elaboradas tabelas por estuário, da seguinte forma:

- realizar coletas padronizadas de crustáceos em três estuários, através de 07 expedições em cada estuário (áreas externa e interna) totalizando 183 meses;
- processar os crustáceos coletados nas 07 expedições;
- digitar os dados coletados e processados nas 07 expedições;
- analisar variações espaciais e temporais nas assembleias de crustáceos de cada estuário, comparando as áreas diretamente e indiretamente impactadas, visando detectar possíveis mudanças nos indicadores da comunidade e na estrutura populacional.

Submeta 2.2 – Coletas para estudos dirigidos de ecologia reprodutiva de espécies de crustáceos de importância comercial e/ou ecológica:

Serão coletados exemplares de crustáceos estuarinos/marinhos para os estudos dos aspectos reprodutivos de espécies selecionadas, de acordo com a importância comercial e/ou ecológica e frequência de ocorrência. As espécies estudadas terão determinados seus períodos reprodutivos, fecundidade, proporção sexual e fator de condição na Meta 10. Dessa forma, pretende-se:

- coleta exaustivas para obtenção de gônadas e dados biométricos;
- fixação das gônadas conforme protocolos específicos.

META 3 - Reprodução de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos

Submeta 3.1 – Estudos dirigidos de reprodução de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos:

Serão estudados aspectos reprodutivos de espécies de peixes e crustáceos selecionadas, de acordo com a importância comercial e/ou ecológica. Serão determinados períodos reprodutivos, fecundidade, proporção sexual e fator de condição das espécies estudadas, visando detectar alterações nestes padrões entre as áreas impactadas e não impactadas, uma vez que se sabe que estes parâmetros da reprodução sofrem alterações em áreas impactadas.

META 4 - Genética de Peixes Estuarinos e Crustáceos – DNA Barcoding e Genética de Populações

Submeta 4.1 – DNA *Barcoding* de peixes e crustáceos marinhos:

Identificação molecular de espécies de peixes e crustáceos marinhos, via DNA mitocondrial (*Barcoding*).

A identificação molecular dos espécimes coletados, em conjunto com a identificação morfológica, contribui para a identificação correta dos espécimes que serão avaliados pelos demais indicadores.

Submeta 4.2 – Genética populacional de peixes estuarinos e crustáceos:

Determinação da diversidade e estruturação genética de espécies previamente selecionadas de peixes estuarinos e duas crustáceos de importância econômica e/ou ecológica coletadas na região do rio Doce, São Mateus e Piraquê-Açú.

Níveis moderados a elevados de variabilidade podem conferir maior probabilidade de sobrevivência de uma população a médio e longo prazo. Desta forma, torna-se importante buscar a manutenção de altos níveis de diversidade genética nas populações.

META 5 - Ecologia trófica de peixes marinhos

Submeta 5.1 – Coletas de amostras:

Realizar coletas (a) semestrais no estuário do Rio Doce de indivíduos de seis espécies de peixes (*Genidens genidens*, *Eucinostomus* spp., *Eleotris pisonis*, *Ctenogobius* spp., *Evorthodus lyricus* e *Microphis lineatus*) que apresentaram diferenças significativas no nicho trófico (com base em ^{13}C e ^{15}N) entre antes e depois do rompimento da barragem de Fundão, para dar continuidade às análises já realizadas (c.f. Andrades et al., 2020); e (b) anuais, de indivíduos de duas espécies de peixes com importância comercial e ecológica no estuário do Rio Doce e em dois estuários controles, não impactados pelo rejeito, para comparações das razões isotópicas de carbono e nitrogênio.

Nas áreas Rio Doce e Piraquê-Açú, a equipe da **Meta 5** é também responsável pelas coletas, triagens, identificação, curação de dados de populações de peixes estuarinos (**Meta 1**), das coletas

e triagens de populações de crustáceos (**Meta 2**) e das coletas para genéticas de peixes estuarinos e crustáceos (**Meta 4**).

Submeta 5.2 – Analisar a ecologia trófica da ictiofauna em escala temporal:

Através de coletas anuais, identificar possíveis impactos do rejeito em médio e longo prazo na razão isotópica de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$), de espécies capturadas no Rio Doce antes e depois do rompimento e que apresentam alterações significativas entre estes dois períodos.

Submeta 5.3 – Analisar a ecologia trófica de espécies sentinelas em escala espacial:

Através de coletas semestrais, investigar os padrões tróficos (conteúdos estomacais e isotópicos) de duas espécies comercialmente e ecologicamente importantes no Rio Doce e em dois estuários controles (não impactados).

META 6 - Telemetria de peixes estuarinos

Submeta 6.1 – Avaliação da movimentação e uso de habitat do robalo (*Centropomus parallelus*) por meio de telemetria acústica:

O robalo é uma espécie de alta importância econômica, social e recreativa na região estudada (RODRIGUES, 2005), capaz de viver tanto na água doce quanto salgada. A compreensão da movimentação entre os ambientes de água doce, estuarino e marinho, é fundamental para a determinação dos impactos causados pelo rompimento da barragem de Fundão sobre a dinâmica desta espécie. Neste cenário, é importante entender como os sedimentos suspensos e os elevados níveis de turbidez, assim como outros fatores abióticos, afetam o comportamento, os padrões migratórios e a resiliência populacional dos robalos em curto e longo prazo no Rio Doce. Além disso, os padrões de movimentação e uso de habitat do robalo no Rio Doce (área impactada) serão comparados ao Rio São Mateus (área controle). Dessa forma, pretende-se:

- Captura e marcação dos robalos (a cada 06 meses);
- Instalação da rede de receptores acústicos no Rio Doce;
- Obtenção de dados e manutenção dos receptores acústicos (a cada 03 meses);
- Monitoramento ativo padronizado no Rio Doce (a cada 01 mês);
- Campanhas intensivas de telemetria ativa no Rio Doce e Rio São Mateus (a cada 01 ano);
- Análise e integração de dados.

META 7 - Microquímica de otólitos

Submeta 7.1 – Estudos de microquímica de otólitos de peixes estuarinos/marinheiros, no estuário

do Rio Doce e área marinha adjacente:

Serão analisadas as concentrações de diversos elementos químicos presentes na matriz dos otólitos de espécies importantes socioeconomicamente na área de estudo. As análises serão realizadas ao longo do período de vida de indivíduos adultos, como mais de 8 anos de idade, gerando dados cronológicos da incorporação dos principais elementos químicos presentes na lama do rejeito da barragem de Fundão. Dessa forma, pretende-se:

- coleta de 150 exemplares de uma espécie, estuarino/marinho, adulta, abundante e frequente;
- processamento dos otólitos dos exemplares coletados durante o período.

META 8 - Estudo de larvas estuarinas

Submeta 8.1 – Monitoramento dos padrões de assentamento e recrutamento de peixes marinhos:

Serão realizadas coletas semestrais com armadilhas de luz ao longo da costa do ES e BA em frente a foz de quatro rios (Mucuri, São Mateus, Doce e Piraquê-açu): Dados de abundância, biomassa e tamanho serão coletados dos indivíduos capturados, assim como variáveis ambientais serão registradas no momento da coleta de dados.

O assentamento/recrutamento larval são uma etapa inicial do ciclo de vida dos peixes de fundamental importância para a manutenção das populações, pois seus sobreviventes determinarão o estoque de indivíduos adultos. Assim, avaliar quais espécies podem ter sido afetadas pelo rompimento da barragem de Fundão é relevante para a manutenção de suas populações. Dessa forma, pretende-se:

- realizar quatro expedições anuais para coleta de larvas de peixes com armadilhas de luz em cada uma das 4 áreas de estudo;
- coletar dados abióticos que representem as variações da condição do mar no momento da amostragem de pós-larvas de peixes marinhos;
- processamento e análise das amostras provenientes das armadilhas de luz e cálculo dos descritores da comunidade (CPUE, diversidade, riqueza, etc.) capturadas pelas armadilhas de luz;
- análise de dados acoplados (amostras de larvas e dados abióticos) para avaliação do impacto sobre a ictiofauna.

META 9 - Comunidades e Populações de Peixes Recifais

Submeta 9.1 – Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais:

Através de censos visuais subaquáticos, serão monitorados a estrutura populacional (ocorrência, abundância, estimativa de tamanho) e os descritores de comunidade biológica (riqueza, diversidade e dominância) das assembleias de peixes recifais marinhos (em dois tipos distintos de habitats recifais - costões rochosos e recifes de corais) afetados pelos rejeitos de minério resultantes do rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG), utilizando um desenho de impacto ambiental.

Espécies de peixes recifais incluem espécies de alta importância econômica das quais dependem milhares de famílias do litoral capixaba e baiano. Muitas destas espécies possuem estoques populacionais em níveis críticos de ameaça. Entender como o rompimento da barragem do Fundão contribuiu para o agravamento deste cenário é de fundamental importância para a segurança alimentar e sustento dessa população tradicional. Dessa forma, pretende-se:

- realizar expedições de mergulho anuais para realização de censos visuais, sendo uma em cada uma das áreas de estudo, a saber: Parque Nacional Marinho de Abrolhos (Arquipélago e Parcel dos Abrolhos), Arco Costeiro do Parcel das Paredes, Arco Costeiro da RESEX do Cassurubá (Recifes de Sebastião Gomes, Nova Viçosa, Coroa Vermelha), Recifes Esquecidos do ES, APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz, Ilhas Costeiras de Vitória e APA de Setiba;
- coletar dados abióticos que representem a complexidade, heterogeneidade e cobertura dos habitats nos recifes **amostrados**;
- planilhamento e análises de dados coletados com censo visual;
- processamento de imagens (fotografias) tomadas para determinação da cobertura bentônica dentro dos censos realizados;
- análise de dados acoplados (censos e foto-quadrados) para avaliação do impacto sobre a ictiofauna recifal.

META 10 - Genética de Populações de Peixes Recifais

Submeta 10.1 – Genética de populações de peixes marinhos/recifais:

Dar-se-á continuidade ao trabalho iniciado desde o primeiro ano de monitoramento onde espécies de interesse comercial e ecológico foram selecionadas e coletadas durante o primeiro ano em 4 regiões ao longo da Área Ambiental 1. Estas espécies vêm sendo estudadas através da utilização de marcadores moleculares nucleares microssatélites, desenvolvidos especialmente para este fim ou através de amplificação cruzada de espécies próximas. Ainda poderão ser realizadas novas coletas de tecido, para as espécies que não atingiram o número de 40 indivíduos por ponto amostral ou mesmo a inclusão de novas espécies de interesse a serem adicionadas na lista de espécies previamente selecionada.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
Meta 1 - Abundância, biomassa e média de tamanho de cada espécie de peixe por unidade amostral (arrasto) das coletas padronizadas; - Sexo e estágio de maturação dos indivíduos das espécies estudadas quanto aos aspectos reprodutivos.	Prof. Maurício Hostim
Meta 2 - Abundância, biomassa e média de tamanho de cada espécie de peixe por unidade amostral (arrasto) das coletas padronizadas; - Sexo e estágio de maturação dos indivíduos coletados quanto aos aspectos reprodutivos;	Prof. Julien Chiquieri
Meta 3 - Índice Gonadossomático de machos e fêmeas; - Fator de condição total e somático para cada espécie; - Índice de Lesão das gônadas;	Profª Juliana Castro Monteiro Pirovani
Meta 4 - Número e nome das espécies de peixes e crustáceos marinhos identificados molecularmente; - Número de sequências <i>Barcoding</i> de peixes e crustáceos geradas para o período de estudo; - Número de tecidos (amostras) que tiveram o DNA extraído e qual a concentração quantificada para cada amostra; - Número de amostras processadas com sucesso para cada marcador testado; - Índices de diversidade genética para cada marcador; - Índice de estruturação genética (espacial e temporal), quando for possível, pois dependerá do número amostral de cada espécie;	Profª Ana Paula Cazerta Farro
Meta 5 - Assinaturas de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) das espécies de peixes, por local e período analisado; - Conteúdo estomacal das espécies de peixes, por local e período analisado;	Prof. Jean-Christophe Joyeux
Meta 6 - Detecções dos indivíduos monitorados, onde cada detecção corresponde à posição de um indivíduo no tempo e espaço;	Prof. Maurício Hostim
Meta 7 - Número de otólitos de peixes estuarinos/marinhos coletados, por espécie; - Número de otólitos cortados, emblocados e preparados em lâminas para análise; - Dados das análises microquímicas dos otólitos;	Prof. Felipe Alexandre Lisboa de Miranda Daros
Meta 8 - Abundância, biomassa e tamanho das pós-larvas de peixes marinhos; - Distribuição espacial das pós-larvas de peixes marinhos; - Dados abióticos e oceanográficos obtidos nas estações amostrais;	Profª Fabiana Cézar Félix Hackradt
Meta 9 - Abundância, biomassa e tamanho das espécies de peixes recifal; - Distribuição espacial das espécies de peixes recifais; - Dados abióticos obtidos nas estações amostrais;	Prof. Carlos Werner Hackradt
Meta 10 - Número de amostras coletadas das espécies de peixes selecionadas; - Número de extrações efetuadas; - Número de amplificações e genotipagens realizadas; - Índice de diversidade genética;	Profª Fabiana Cézar Félix Hackradt

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
Meta 1 - Variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes estuarinos/marinhos; - Variações espaciais e temporais nos aspectos reprodutivos das populações de peixes estuarinos/marinhos;	Prof. Maurício Hostim
Meta 2 - Variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de crustáceos estuarinos/marinhos; - Variações espaciais e temporais dos aspectos reprodutivos das populações do camarão sete-barbas;	Prof. Julien Chiquieri
Meta 3 - Análises das variações espaciais e temporais dos parâmetros reprodutivos descritos abaixo das espécies de peixes e crustáceos selecionadas;	Profª Juliana Castro Monteiro Pirovani
Meta 4 - Identificação molecular das espécies via DNA mitocondrial (<i>Barcoding</i>) de espécies de peixes e de crustáceos marinhos capturadas por unidade amostral e ano de amostragem; - Análise espaço-temporal da diversidade genética de peixes estuarinos e crustáceos na região; - Análise de estruturação, demonstrando a presença de uma ou mais populações das espécies de peixes estuarinos e crustáceos no litoral do ES;	Profª Ana Paula Cazerta Farro
Meta 5 - Variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais de peixes estuarinos/marinhos; - Amplitude de nicho isotópico, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (obtidas através de modelo SIBER) de seis espécies de peixes em períodos anteriores (novembro/2015) e posteriores (junho/2016, junho/2019, novembro/2019, julho/2020, novembro/2002, julho/2021, novembro 2021, junho 2022) ao rompimento; - Determinação da variação da dieta (itens alimentares, nicho nutricional e isotópico) de duas espécies entre a área impactada (estuário do Rio Doce) e áreas controles;	Prof. Jean-Christophe Joyeux
Meta 6 - Definição da área de vida do robalo (<i>Centropomus parallelus</i>) por meio do método de Densidade de Kernel (KUD); - Estimativa dos índices de residência (IR) e fidelidade (IF); - Análises de distância percorrida; - Avaliação do efeito dos fatores abióticos sobre a presença e ausência dos robalos na foz do Rio Doce;	Prof. Maurício Hostim
Meta 7 - Análise de diversos elementos químicos (mais abundantes na lama de rejeito da barragem de Fundão) entre o núcleo e a borda dos otólitos; - Assinatura química dos otólitos;	Prof. Felipe Alexandre Lisboa de Miranda Daros
Meta 8 - Variações espaço-temporais nos padrões de assentamento de larvas na foz de rios estudados; - Comparação dos descritores ecológicos do assentamento através da análise de variância desbalanceada (Beyond-BACI) entre zonas impacto vs. controle;	Profª Fabiana César Félix Hackrad
Meta 9 - Variações espaço-temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes recifais; - Comparação dos descritores da assembleia de peixes, através da análise de variância desbalanceada (Beyond-BACI), entre zonas impacto vs. Controle;	Prof. Carlos Werner Hackrad
Meta 10 - Diversidade genética das espécies de peixes marinho/recifais; - Avaliação de estruturação genética de peixes entre as localidades amostradas;	Profª Fabiana César Félix Hackrad

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

Os pontos componentes da malha amostral do “Tema: Peixes e Crustáceos Marinhos” constam na

Tabela 3 e na Figura 13. Coletas mensais serão realizadas para estudo das comunidades e populações de peixes e crustáceos estuarinos/marinho na foz do rio Doce (distrito de Regência - Linhares/ES), área diretamente impactada pelo rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG), e sua área marinha adjacente. Além desta, visando o monitoramento de um gradiente das áreas indiretamente atingidas pelo desastre, serão estudados os estuários dos rios São Mateus (ao norte) e Piraquê-Açu (ao sul), suas áreas marinhas adjacentes. Em cada estuário (rio e área adjacente) serão amostrados 06 pontos distantes 2 km entre si, 02 nos rios e 04 nas áreas marinhas adjacentes. Os pontos estudados pelo grupo da hidrogeoquímica/sedimentologia estão localizados entre a APA Costa dos Corais e o estuário do rio Itaúnas. As amostras coletadas serão ainda utilizadas para as análises de DNA *barcoding*, genética de populações e biologia reprodutiva de peixes estuarinos e crustáceos. A coleta de dados e material para os estudos de telemetria estuarina será realizada em pontos aleatórios nos estuários e áreas adjacentes dos rios Doce e São Mateus, enquanto para a microquímica de otólitos serão coletados indivíduos de grande porte (maiores de 8 anos de idade) nas regiões estuarinas dos rios Benevente/Itapemirim, Piraquê-açu, Doce e São Mateus.

Para o monitoramento da ictiofauna recifal um desenho de impacto ambiental Beyond-ACI (modificado de UNDERWOOD, 1991, 1992, 1993 e 1994; GLASBY 1997) está sendo adotado deste o ano 1 do PMBA. O monitoramento será realizado em uma base anual (verão) compreendendo duas regiões, uma ao norte da APA Costa dos Corais (área impacto) e outra ao sul desta. Esta alteração teve como intuito melhorar o monitoramento espacial, cobrindo dois tipos distintos de habitat (recifes de corais e costões rochosos), de forma a controlar os efeitos da variabilidade espacial. Para a avaliação de impacto na região norte os Recifes Esquecidos serão o primeiro controle (C1), os recifes adjacentes à RESEX do Cassurubá (Viçosa, Coroa Vermelha e Sebastião Gomes) o C2, Parcel das Paredes é o C3, e finalmente os recifes do PARNA Abrolhos serão o C4. Por outro lado, costões rochosos dentro e no entorno da APA Costa das Algas e a REVIS Santa Cruz, serão avaliados como a área de Impacto para os peixes recifais, tendo como controles ao sul as Ilhas e Ilhotes de Vitória (C5) e Ilhas e Ilhotes da APA de Setiba (Guarapari – C6).

A área de amostragem das espécies marinho/recifais contempla toda a área costeira da APA de Setiba até o Banco de Abrolhos, na Bahia. Os organismos amostrados, devido sua ampla distribuição zoogeográfica, são separados por agrupamentos amostrais compondo populações hipotéticas estabelecidas de acordo com a proximidade geográfica da área impacto e áreas adjacentes com menor concentração da pluma de rejeito, identificadas como áreas: A1 - Norte de Abrolhos e Royal Charlotte, A2 - Sul do banco de Abrolhos, A3 - Plataforma estreita entre Linhares e Piúma (impacto), A4 - região sul de Piúma, utilizando dados complementares de 4 portos de desembarque pesqueiro, sendo eles: Portos de Vila Velha (V), Santa Cruz (S), Guarapari (G), e Porto Seguro - BA (PP). No entanto, para espécies que dependem dos ambientes costeiros em pelo menos parte de sua vida, amostras estão sendo coletados concomitantemente com as campanhas de amostragem da equipe do CEUNES/UFES de peixes estuarinos, utilizando rede de arrasto nos estuários do Rio Doce e do Rio São Mateus.

O padrão de recrutamento e assentamento de peixes marinhos está sendo avaliado a partir de um desenho de impacto ambiental Beyond-BACI (modificado de UNDERWOOD, 1991, 1992, 1993 e 1994;

GLASBY 1997). Para tal consideramos a foz do Rio Doce como área “impacto” e em contraste outras três localidades são consideradas áreas “controle”, são elas a foz do rio Piraquê-Açu (C1- controle 1), a foz do rio São Mateus (C2 - controle 2) e a foz do rio Mucuri (C3 - controle 3). As amostragens estão sendo realizadas em uma frequência trimestral a partir da instalação das armadilhas luminosas, sendo 2 monitoramentos na estação seca e dois na chuvosa, buscando controlar a variação natural dos dados gerada pela reprodução sazonal diferencial das espécies de peixes marinhos.

Figura 13: Mapa da área de estudo do Tema “Peixes e Crustáceos Marinhos”, onde são observados os pontos de amostragem de cada subtema.

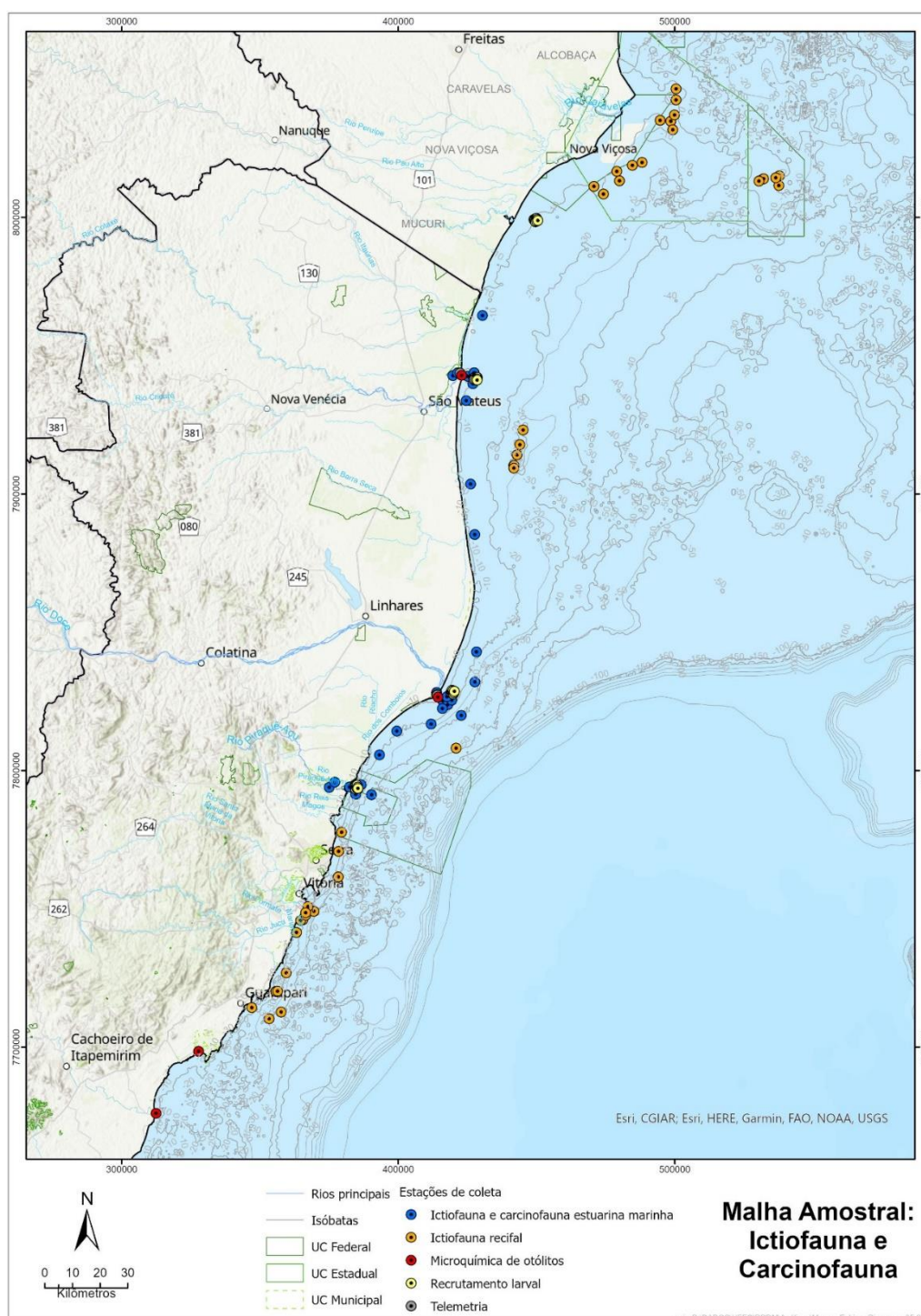


Tabela 3: Detalhamento da malha amostral do Tema “Peixes e crustáceos marinhos” com os nomes das estações, códigos e coordenadas dos pontos em UTM (SIRGAS 2000).

Tema	Nome da estação	Código do ponto	Northing	Easting
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	SM01	7942784,4100	419729,5900
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	SM02	7943784,9300	421452,8000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	SM03	7942550,9700	425158,0400
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	SM04	7941979,6100	427286,9900
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	SM05	7943853,6400	427435,4800
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	SM06	7939870,9500	426992,0800
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	ITA01	7964547,0000	430449,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	São Mateus	CB01	7933756,0000	424570,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Barra Nova	BN02	7903598,0000	426147,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Barra Seca	BS01	7885331,0000	427648,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	SDN13	7842923,0000	428269,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	SDN30	7832036,1300	427720,9600
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	SD03	7819937,0000	422769,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	SDS20	7816813,0000	411879,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	PA0	7793915,0000	375019,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	PA01	7795798,0000	377029,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	PA03	7794035,0000	382331,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	PA04	7793323,0000	385460,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	PA05	7794865,0000	386549,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	PA06	7791417,0000	384598,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	RD01	7828224,0000	413859,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	RD02	7827448,0000	413884,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	RD03	7825335,0000	416012,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	RD04	7823800,0000	417877,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	RD05	7825443,0000	419357,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	RD06	7822434,0000	415948,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Piraquê-Açu	CA 02	7791253,0000	390338,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Barra do Riacho	SDS19	7805649,0000	393211,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Comboios	SDS13	7814269,0000	399459,0000
Ictiofauna e carcinofauna estuarina marinha	Rio Doce	SD 01	7826708,0000	417558,0000
Ictiofauna recifal	APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz	I1	7777700,0560	379517,0065
Ictiofauna recifal	APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz	I2	7770771,2280	378420,1669
Ictiofauna recifal	APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz	I3	7761332,5700	378143,2819
Ictiofauna recifal	APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz	I4	7761534,1450	378318,4119
Ictiofauna recifal	APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz	I5	7808095,2990	420904,4619
Ictiofauna recifal	APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz	I6	7746069,0000	365574,9649
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_1	7917828,7800	443942,6327

Tema	Nome da estação	Código do ponto	Northing	Easting
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_2	7914168,9670	442944,0341
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_3	7910353,1690	441768,1354
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_4	7910301,1070	441750,3940
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_5	7910367,8590	441866,0359
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_6	7909355,0160	441779,9971
Ictiofauna recifal	Recifes Esquecidos	C1_7	7923146,8320	445132,3767
Ictiofauna recifal	Recifes adjacentes RESEX Cassuruba	C2_1	8008462,0910	474184,9762
Ictiofauna recifal	Recifes adjacentes RESEX Cassuruba	C2_2	8011229,8410	470748,9833
Ictiofauna recifal	Recifes adjacentes RESEX Cassuruba	C2_3	8016668,2120	478997,9602
Ictiofauna recifal	Recifes adjacentes RESEX Cassuruba	C2_4	8013253,8950	479978,8923
Ictiofauna recifal	Recifes adjacentes RESEX Cassuruba	C2_5	8018857,3730	484648,1412
Ictiofauna recifal	Recifes adjacentes RESEX Cassuruba	C2_6	8019884,2640	488137,3103
Ictiofauna recifal	Parcel das Paredes RESEX Cassuruba	C3_1	8035104,8620	494665,1107
Ictiofauna recifal	Parcel das Paredes RESEX Cassuruba	C3_2	8034792,4300	498524,5284
Ictiofauna recifal	Parcel das Paredes RESEX Cassuruba	C3_3	8031716,8530	499238,0029
Ictiofauna recifal	Parcel das Paredes RESEX Cassuruba	C3_4	8037056,0440	499867,4893
Ictiofauna recifal	Parcel das Paredes RESEX Cassuruba	C3_5	8042500,2920	500424,1500
Ictiofauna recifal	Parcel das Paredes RESEX Cassuruba	C3_6	8046497,4470	500426,3560
Ictiofauna recifal	PARNA dos Abrolhos	C4_1	8013800,2340	531704,6104
Ictiofauna recifal	PARNA dos Abrolhos	C4_2	8013980,2820	532088,4221
Ictiofauna recifal	PARNA dos Abrolhos	C4_3	8013153,4970	530412,8645
Ictiofauna recifal	PARNA dos Abrolhos	C4_4	8015061,9060	537802,0448
Ictiofauna recifal	PARNA dos Abrolhos	C4_5	8011553,8910	537581,3302
Ictiofauna recifal	PARNA dos Abrolhos	C4_6	8014337,3990	536481,0623
Ictiofauna recifal	Vitória	C5_1	7745810,0690	364727,0438
Ictiofauna recifal	Vitória	C5_2	7747731,8540	366586,7371
Ictiofauna recifal	Vitória	C5_3	7749125,7800	369482,8427
Ictiofauna recifal	Vitória	C5_4	7750806,7420	367356,3725
Ictiofauna recifal	Vitória	C5_5	7748592,6650	366510,1102
Ictiofauna recifal	Vitória	C5_6	7741463,8480	363186,1328
Ictiofauna recifal	Guarapari	C6_1	7710247,8940	353309,8229
Ictiofauna recifal	Guarapari	C6_2	7712673,9740	357649,7026
Ictiofauna recifal	Guarapari	C6_3	7726835,6650	359503,4337
Ictiofauna recifal	Guarapari	C6_4	7720116,2400	355675,6133
Ictiofauna recifal	Guarapari	C6_5	7720219,3220	356342,8228
Ictiofauna recifal	Guarapari	C6_6	7714269,5320	347043,1726
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_1	7942247,0000	427561,7000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_2	7942226,0000	428067,2000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_3	7942195,0000	428558,4000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_4	7941766,0000	427548,0000

Tema	Nome da estação	Código do ponto	Northing	Easting
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_5	7941738,0000	428042,8000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_6	7941699,0000	428519,7000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_7	7941278,0000	427502,4000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_8	7941222,0000	428010,9000
Recrutamento larval	São Mateus	LTC2_9	7941197,0000	428516,4000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_1	7828145,0000	418951,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_2	7828602,0000	419159,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_3	7829045,0000	419390,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_4	7827938,0000	419420,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_5	7828396,0000	419632,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_6	7828849,0000	419833,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_7	7827704,0000	419921,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_8	7828164,0000	420127,0000
Recrutamento larval	Rio Doce	LTl_9	7828652,0000	420289,0000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_1	7999258,0000	449049,4000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_2	7999498,0000	449471,8000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_3	7999704,0000	449935,9000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_4	7998833,0000	449291,6000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_5	7999071,0000	449731,9000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_6	7999299,0000	450197,4000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_7	7998411,0000	449580,4000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_8	7998644,0000	450010,2000
Recrutamento larval	Mucuri	LTC3_9	7998893,0000	450455,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_1	7794216,0000	384185,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_2	7793738,0000	384417,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_3	7793288,0000	384583,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_4	7794461,0000	384662,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_5	7794020,0000	384877,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_6	7793527,0000	385049,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_7	7794652,0000	385071,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_8	7793992,0000	385352,0000
Recrutamento larval	Piraquê-Açu	LTC1_9	7793560,0000	385408,0000
Microquímica de otólitos	Benevente	Ben	7698472,9700	327787,0800
Microquímica de otólitos	Itapemirim	Itap	7737696,0000	208272,0000
Microquímica de otólitos	Rio Doce	RD	7827220,1700	413996,7800
Microquímica de otólitos	São Mateus	SM	7943722,2200	422346,9600
Telemetria	Rio Doce	RD	7827220,1700	413996,7800
Telemetria	São Mateus	SM	7943722,2200	422346,9600

6.2. Procedimentos de campo e laboratório

6.2.1. Comunidades e Populações de Peixes e Crustáceos Estuarinos/Marinhos (Metas 1 e 2)

Para as coletas padronizadas de peixes e crustáceos serão realizados três arrastos de cinco minutos em cada ponto por campanha, utilizando-se redes de arrasto de fundo com portas (semelhantes aquelas empregadas na pesca do camarão da região estudada), operadas por embarcação de médio porte, adequada ao esforço, às condições ambientais e aos objetivos. Em cada arrasto, serão anotadas coordenadas geográficas (com auxílio de GPS), e ainda, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e transparência (de fundo e superfície), com auxílio de uma sonda multiparâmetros. Peixes e crustáceos coletados serão acondicionados em sacos plásticos identificados quanto ao arrasto, ponto e data de coleta, e acondicionados em gelo para transporte ao laboratório, onde permanecerão armazenados em congelador até o momento da triagem em laboratório.

No laboratório (triagem), os peixes serão identificados até o menor nível taxonômico possível, fotografados, medidos (comprimentos padrão e total - CP e CT) em milímetros com ictiômetro, e pesados (o mais próximo de 0,01g) com balança. Já os crustáceos, serão fotografados, identificados no menor nível taxonômico possível, medidos (com auxílio de paquímetro digital) quanto ao comprimento total (CT) e comprimento da Carapaça (CC) em mm, e pesados (g) com auxílio de balança (precisão 0,01g).

Após os procedimentos de laboratório, alguns exemplares de cada espécie de peixes e crustáceos serão selecionados para tombamento em coleção zoológica, até que se tenha representantes de todas as espécies amostradas.

6.2.2. Coletas para estudos dirigidos de ecologia reprodutiva espécies de peixes e crustáceos de importância comercial e/ou ecológica (Meta 3)

Além dos peixes e crustáceos coletados por arrasto de fundo com portas, conforme descrito nas linhas de ações 01 e 08 (Comunidades e Populações de Peixes e Crustáceos Estuarinos e Marinhos), exemplares de peixes e crustáceos serão obtidos junto a peixarias das áreas estudadas, visando amostrar exemplares de importância comercial. Além disso, com o auxílio de pescadores locais, coletas complementares serão empregadas nestas áreas, utilizando os petrechos necessários (redes de emalhe de diversas malhas, linhas de mão, espinhéis) à captura de indivíduos em atividade reprodutiva. Os peixes e crustáceos serão identificados, medidos e pesados conforme descrito nas metas 01 e 08.

6.2.3. DNA Barcoding de peixes e crustáceos (Meta 04)

Para os estudos de DNA *Barcoding*, porções dos músculos e/ou nadadeiras de cinco exemplares (quando possível) de cada espécie serão removidas, armazenadas em microtubos plásticos com álcool 96%, e mantidas congeladas até o processamento. Este procedimento será realizado para todos os espécimes coletados. Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Laboratório de Genética e Conservação Cetáceos (LAGEC), no prédio BIOAQUA, localizado no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em São Mateus.

6.2.4. Genética populacional de peixes estuarinos e crustáceos (Meta 04)

Para os estudos de genética populacional, porções dos músculos e/ou nadadeiras de exemplares de cada espécie selecionada serão removidas, armazenadas em microtubos plásticos com álcool 96%, e mantidas congeladas até o processamento. As amostras serão armazenadas em microtubos e conservados em álcool 70%. Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Laboratório de Genética e Conservação Cetáceos (LAGEC), no prédio BIOAQUA, localizado no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em São Mateus.

O DNA das amostras será extraído, quantificado em espectrofotômetro e amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a utilização de marcadores moleculares do DNA mitocondrial, DNA nuclear e/ou marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os produtos do PCR serão sequenciados e/ou genotipados.

6.2.5. Ecologia trófica de peixes marinhos (Meta 05)

Para investigar os impactos do rejeito na ecologia trófica da ictiofauna marinha, serão utilizadas duas abordagens. A primeira consiste no uso de assinaturas de isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) de indivíduos de seis espécies de peixes coletados no estuário do Rio Doce (*Genidens genidens*, *Eucinostomus* spp., *Eleotris pisonis*, *Ctenogobius* spp., *Evorthodus lyricus* e *Microphis lineatus*) antes do rompimento (início de novembro 2015) e depositados na Coleção Ictiológica da UFES, bem como de indivíduos destas mesmas espécies coletados semestralmente após o rompimento (a partir de junho de 2016). Amostragens em meses similares aos citados serão realizadas no Rio Doce nos próximos anos (2022 e 2023), a fim de comparar as mudanças observadas entre antes e depois do rompimento com potenciais alterações sazonais na ecologia trófica das espécies, depois do rompimento. Os espécimes serão coletados por meio de petrechos comumente utilizados por pescadores, como peneiras, redes tipo “picaré”, puçás, arrastos de fundo com portas, etc.

Uma segunda abordagem será empregada analisando o nicho trófico, nutricional e isotópico a partir de análises dos conteúdos alimentares, estimativa de composição de macronutrientes e assinaturas isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) de duas espécies de peixes na área diretamente impactada (estuário do Rio Doce) e em duas áreas controles de menor ou sem influência. Os espécimes serão coletados preferencialmente por meio de arrastos de fundo com portas ou, caso necessário, mediante uso de outros petrechos. Adicionalmente, potenciais fontes alimentares (e.g., produtores primários e consumidores primários e secundários) serão coletadas nas áreas impactada e controles para posterior estimativas da dieta via modelos de mistura.

6.2.6. Telemetria de peixes estuarinos (Meta 06)

O sistema de rastreamento utilizado no estudo de telemetria estuarina é composto por transmissores e receptores da VEMCO®. No presente estudo serão utilizados dois tipos de transmissores (contínuo e codificado) que emitem sinais acústicos singulares e identificáveis; e seus respectivos receptores, VR100 e VR2W. Para ambos os métodos (telemetria ativa e passiva), os exemplares de robalo serão capturados através de métodos não letais para o implante dos transmissores acústicos. Todos os

indivíduos serão previamente anestesiados e uma incisão de 20 mm será realizada na cavidade celomática para a inserção do transmissor acústico. Após a sutura do corte, os indivíduos serão monitorados por cerca de 20 minutos, sendo posteriormente devolvidos ao local de captura.

No Rio Doce será instalado uma rede de receptores VR2W, englobando a região entre a foz do Rio Doce até Linhares. Cada receptor VR2W será fundeado acoplado a duas poitas de concreto de 20 kg cada, presas por correntes e sinalizadas com bóia. Para obtenção dos dados de telemetria passiva no Rio Doce, os receptores VR2W fundeados serão recuperados trimestralmente por meio de mergulho autônomo.

O monitoramento por telemetria ativa no Rio Doce e São Mateus será realizado usando uma embarcação e busca ativa dos indivíduos marcados utilizando um hidrofone móvel conectado ao receptor VR100. As coletas de dados ocorrerão durante duas campanhas intensivas de 10 dias de rastreamento em cada rio estudado. Totalizando um esforço de campo de 160 horas em cada rio.

6.2.7. Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos (Meta 07)

Serão coletados ao menos 30 exemplares adultos de cada espécie selecionada ao longo dos cinco estuários (Itapimirim, Benevente, Piraquê-açu, Doce e São Mateus). Após a coleta, os exemplares serão acondicionados em caixa térmica e levados para laboratório, onde serão medidos (comprimento padrão em centímetros), pesados (gramas), e dissecados para a retirada dos otólitos, que serão limpos de tecidos orgânicos e armazenados em tubos Eppendorf. Posteriormente, os otólitos esquerdos serão emblocados em resina epóxi e cortados transversalmente em lâminas delgadas (200-300 μ m) com auxílio de uma cortadeira de precisão. Uma vez prontos os cortes dos otólitos, os mesmos terão sua idade determinada e posteriormente passarão pelo processo de ablação a laser, através de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivo por ablação laser (ICP-MS-LA), para a determinação química de cada otólito analisado. Os elementos, serão analisados através de um transecto entre o núcleo (informações referentes a origem da vida do peixe) e a borda (informações referentes a momentos antes de ser sacrificado) do otólito, que mostrará a concentração de cada elemento ao longo da vida de cada espécie.

6.2.8. Estudo de larvas estuarinas (Meta 08)

Em frente a cada desembocadura dos rios selecionados (Mucuri, São Mateus, Doce e Piraquê-Açu), estão sendo instalados 9 armadilhas luminosas em grids de 500 x 500 m por duas noites consecutivas. Essa alteração na frequência amostral em relação ao Ano 1 do PMBA se fez necessária pois identificamos muitas flutuações no aporte de larvas ao ambiente costeiro reflexos dos padrões reprodutivos das espécies marinhas, necessitando de maior resolução temporal para entender a diferença das flutuações naturais das causadas em função do impacto do rompimento da barragem. As armadilhas são instaladas com auxílio de uma poita, cabo e boia, e permanecem na superfície desde o pôr do sol até o nascer, durante 10-12h aproximadamente, entre as 17h e 5h da manhã. As larvas capturadas são transferidas para um frasco identificado onde permanecerão em álcool 70% até a triagem em laboratório. Neste, as mesmas são identificadas em lupa, pesadas e mensuradas com

auxílio de um paquímetro digital. Os melhores exemplares estão sendo separados para compor a coleção de referência de larvas de peixes do Laboratório de Ecologia e Conservação Marinha da UFSB.

Simultaneamente, a amostragem de dados abióticos (salinidade, temperatura, transparência da água, oxigênio dissolvido, etc.) são obtidas através do emprego de uma sonda multiparâmetro assim como dados oceanográficos (velocidade e direção da corrente, velocidade e direção do vento, etc.) são obtidos *in situ* através de visualização direta ou através de boias oceanográficas e/ou plataformas digitais de monitoramento oceanográfico.

6.2.9. Comunidades e populações de peixes recifais (Meta 09)

Em cada uma das localidades, seis setores aleatórios são avaliados, nos quais, seis censos visuais são realizados em cada setor, tendo como unidade amostral os censos visuais em ponto fixo com 8m de diâmetro. Para peixes juvenis e menores do que 20 cm de comprimento total, o diâmetro adotado no censo em ponto fixo é de 4 m, para minimizar os erros associados a estimativa de peixes pequenos. Assim sendo, o desenho amostral proposto para cada área é avaliado da seguinte forma: Impacto *versus* Controle (IvsC), fator fixo de 2 níveis; Localidade (L) fator aleatório de 5 níveis para área norte e de 3 níveis para área sul; Setor, fator aleatório de 6 níveis.

Em cada censo visual, a abundância de peixes é avaliada por um mergulhador treinado para identificação visual de peixes recifais até o menor nível taxonômico possível. Conjuntamente a identificação da espécie o observador estima a abundância e a classe de tamanho dos peixes através de classes de abundância e tamanho. Os mergulhadores que realizam os censos são treinados periodicamente quanto a precisão e acurácia na coleta de dados de estimativa visual de abundância e tamanho dos indivíduos, assim como na identificação das espécies. A abundância é registrada em classes com base em uma escala logarítmica (de base 2) e a estimativa de tamanho se dá em classes de 2 em 2 cm (cf. HARMELIN, 1987; GARCÍA-CHARTON & PÉREZ-RUZAFÁ, 2001; HACKRADT et al., 2011), sendo estimado apenas o comprimento total dos indivíduos nestas classes (i.e.: HACKRADT et al., 2011). Após o censo de peixes, o observador coleta os dados abióticos referentes à: a) Heterogeneidade do habitat – Tipo de substrato (estimando visualmente em % de rocha, % de areia; % de cascalho, % de outros); b) Cobertura (através da realização de 2 fotoquadrados por censo); c) Complexidade (contagem do: número de blocos pequenos, medianos e grandes; estimativa visual da rugosidade (1 a 4, sendo 1 o terreno liso e 5 o mais arrugado e alto possível) e a inclinação do terreno (em escala visual: 0-30°, 30-60°, 60-90 °) (cf.: FÉLIX-HACKRADT et al., 2014), além de profundidade e temperatura da água. Estes parâmetros são aplicados para controlar a variância entre os censos realizados. Os fotoquadrados são estruturas em pvc de 70 x 80 cm compostos por 15 fotos de alta resolução perfazendo uma área amostral de 0,7 m². Cada foto é avaliada quanto aos principais grupos bentônicos que recobrem o fundo (corais, algas, gorgônias, zoantídeos, esponjas, algas calcárias, equinodermos e outros organismos) através de software específico, o CPCe.

6.2.10. Estudos de genética de populações de peixes recifais (Meta 10)

Para a análise da genética de populações de espécies marinho/recifais foram selecionadas 6 espécies de peixes para dar continuidade aos estudos iniciados. Porções das nadadeiras ou de

músculo de pelo menos 40 exemplares (adultos e/ou juvenis) de cada espécie são amostradas em cada localidade como descrito acima. Grande parte dessas amostras já se encontram no Laboratório de Ecologia e Conservação Marinha da UFSB, necessitando somente amostragens complementares para alcançar o número amostral mínimo em cada localidade e para cada espécie. Estas amostras são conservadas álcool PA e armazenadas congeladas em frascos plásticos até que sejam processadas.

As extrações de DNA a partir dos tecidos da nadadeira são feitas segundo o protocolo do kit de extração empregado ou através do método de extração salina no qual o tecido é adicionado a uma solução tampão de lise e proteinase K para sua digestão. O DNA é quantificado e sua qualidade é determinada através de espectrofotômetro de ácidos nucleicos e proteínas.

Os marcadores moleculares microssatélites para as espécies selecionadas já foram desenvolvidos e/ou sintetizados e otimizados para as 15 espécies de interesse ao longo dos 3 primeiros anos do PMBA, e, portanto, serão utilizados para avaliar as 6 espécies selecionadas durante o período deste plano de trabalho. As amostras serão amplificadas segundo protocolos específicos para cada marcador microssatélite confeccionado para as espécies de interesse e/ou transferidos, sendo o produto de PCR genotipado através de analisador genético SeqStudio.

6.3. Análise de dados

6.3.1. Comunidades e Populações de Peixes e Crustáceos Estuarinos/Marinhos (Metas 1 e 2)

Para representação do esforço amostral, será construída a curva do coletor, utilizando-se modelos de ajuste da curva para estimativas da riqueza total (Chao *et al.*, 2009; 2020), para peixes e crustáceos separadamente. Serão calculados a abundância relativa (%) dos exemplares por espécie (número e peso), e os descritores das assembleias, como o índice de diversidade e equitatividade.

A variação da abundância, biomassa e dos descritores da assembleia será testada por PERMANOVA (Anderson *et al.*, 2008), considerando como fatores fixos estação do ano e estuário. A análise será baseada em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis com 9999 permutações (Anderson, 2017). Análises multivariadas de ordenamento e agrupamento (modo hierárquico aglomerativo) serão realizadas utilizando espécies que representarão mais de 1% da abundância numérica de cada estuário (Clarke *et al.*, 2014). Os dados relativos aos fatores ambientais serão submetidos a modelos lineares baseados em distância (DistLM/RDA) usando a mesma matriz biológica submetida à PERMANOVA, com intuito de avaliar a relação das variáveis preditoras com a ocorrência e abundância das espécies. O critério AIC será utilizado para seleção do modelo mais parcimonioso usando a abordagem BEST.

6.3.2. Biologia reprodutiva de peixes e crustáceos (Meta 03)

Os aspectos macroscópicos das gônadas de peixes, como maturação, estádios gonadais e determinação do sexo serão definidos utilizando escala adaptada por Vazzoler (1996) e Brown-Peterson *et al.* (2011), através de características das gônadas, como cor, volume, grau de turgidez,

irrigação periférica, tamanho em relação à cavidade celomática, presença ou ausência de sêmen ou ovócitos. Serão considerados os estágios: imaturo, em desenvolvimento, capaz de desovar (para fêmeas) e capaz de espermiar (para machos), hidratado (somente para fêmeas), regredindo e regenerando. Para crustáceos, os indivíduos serão sexados e o estágio de maturação gonadal será identificado. As fêmeas serão identificadas pela presença do tólico e o seu estágio de maturação será avaliado em função da coloração das gônadas (LARA, 1972): estágio I (imatura), estágio II (em desenvolvimento), estágio III (madura) e estágio IV (vazia). Os machos serão avaliados por observação macroscópica do petasma, sendo os não fusionados considerados imaturos e os fusionados, maduros (AMADO, 1978).

O período reprodutivo, a fecundidade absoluta dos indivíduos, e a época de desova serão estimados. Para determinação do período reprodutivo, serão utilizados concomitantemente a análise da variação temporal da frequência de ovários nos distintos estádios de maturidade, classificados macroscopicamente, e indicadores quantitativos da fase em que a gônada se encontra dentro do processo de maturação. Para complementar a avaliação do período reprodutivo, será estimado, para cada indivíduo o fator de condição (K), que reflete as condições nutricionais recentes através da relação entre peso e comprimento e fator de condição somático (K') (VAZZOLER, 1996):

Para a descrição do ciclo reprodutivo serão analisadas as variações mensais do IGS (índice gonadossomático), o qual considera o peso dos ovários ou testículos e o peso total do indivíduo. O IGS será estimado para todos os indivíduos através da utilização do cálculo do RGS, sendo que um aumento desse indicador reflete um aumento no peso das gônadas, indicando assim atividade reprodutiva (VAZZOLER, 1996). Através do RGS, será calculado o RGS total (RGSt), que expressa a porcentagem em que as gônadas representam sobre o peso total (PT), e o RGS somático (RGSs), que expressa a porcentagem que a gônada representa em relação ao peso corporal (PC). A partir dos valores de RGSt e RGSs mensais de machos e fêmeas, será definido o valor de Δ RGS.

A fecundidade total será estimada, conforme Vazzoler (1996), para o peso total dos ovários.

6.3.3. Análise morfológica das gônadas de peixes e crustáceos (Meta 03)

Após análises macroscópicas, para validação dos estádios de maturação gonadal realizada previamente, análises microscópicas serão realizadas. As gônadas serão fixadas em formalina 10% por 24 horas, lavadas em tampão fosfato e armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, fragmentos da porção mediana das gônadas de machos e fêmeas serão processados para inclusão em parafina, cortes histológicos serão obtidos em micrótomo rotativo (5 a 7 μ m) e as lâminas histológicas serão coradas com Hematoxilina & Eosina. Cortes serão examinados em microscópio óptico quanto ao desenvolvimento das células e organização interna do órgão (VAZZOLER, 1996), subsidiando o reconhecimento de sexo e estágio de maturação.

Análises morfológicas serão realizadas a fim de identificar alterações histopatológicas como necrose, infiltrado inflamatório, atrofia, alterações vasculares e nucleares, de acordo com o método proposto por Bernet e colaboradores (1999). Esse método, baseia-se na relevância patológica e na extensão das lesões observadas nos órgãos analisados. As alterações foram classificadas em cinco padrões de

reação e cada lesão possui um grau de importância. O Índice do Órgão (Iorg) representa o grau de dano apresentado pelo órgão. Já o Índice de Reação (Irp), avalia a gravidade das alterações identificadas.

6.3.4. *DNA Barcoding de peixes estuarinos e crustáceos (Meta 04)*

Para a análise de DNA *Barcoding*, serão sequenciados segmentos parciais do gene mitocondrial COI de cinco indivíduos de todas as espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao longo do período do monitoramento. As sequências obtidas serão submetidas aos bancos de dados *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e *BOLD* (<http://www.boldsystems.org/>), para verificar a correspondência e similaridade com as sequências previamente armazenadas nesses bancos. Após essa verificação, o software *MEGA v.6* (Tamura et al. 2013) será utilizado para gerar a árvore de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) com base no modelo de substituição de parâmetros Kimura-2 (K2P) (Kimura 1980). A confiança dos ramos será verificada por *Bootstrap* de 10.000 repetições (Felsenstein 1985).

6.3.5. *Genética populacional de peixes estuarinos e crustáceos (Meta 04)*

Em relação às análises do DNA mitocondrial, as sequências serão alinhadas com o programa *MEGA v.6* (Tamura et al. 2013). Os índices de diversidade e estruturação genéticos serão acessados com os programas *Arlequin v.3.5* (Excoffier et al. 2010), *DNAsp* (Rozas et al. 2010) e *Network* (Bandelt et al. 1999). Quanto às análises do DNA nuclear, os genótipos serão avaliados no programa *GeneMapper v.5.0* (Applied Biosystems) e os índices de diversidade e estruturação genética serão avaliados com os programas *Arlequin v.3.5* (Excoffier et al. 2010), *Bottleneck v. 1.2.02* (Cornuet & Luikart, 1996) e *Structure v.2.3.2* (Pritchard et al. 2000). Caso sejam utilizados SNPs, será construída uma biblioteca de SNPs e em seguida as leituras dos *reads* serão realizadas. A qualidade, filtragem e montagem dos catálogos de SNPs serão aferidos com os programas *FastQC* (Wingett 2018), *MultiQC* (Ewels et al. 2016), *Trimmomatic v.0.32* (Bolger et al. 2014) e *STACKS* (Catchen et al. 2011). O rastreamento dos SNPs e a aplicação dos filtros serão realizados com os programas *Bowtie2* (v2.2.4) e *Populations* do *STACKS*, respectivamente.

6.3.6. *Ecologia trófica de peixes marinhos (Meta 05)*

As assinaturas isotópicas das seis espécies de peixes coletadas no estuário do Rio Doce antes e depois do rompimento serão inseridas no modelo *SIBER* (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R; Jackson et al. 2011), para analisar as mudanças na amplitude e na sobreposição do nicho trófico entre os períodos, para cada espécie. Para isso, serão utilizadas as funções *niche.overlap*, *Bayesian.layman* e *siberEllipses* no software *R* (Layman et al., 2007; Jackson et al. 2011).

Para testar se ocorreram mudanças na amplitude de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em indivíduos das seis espécies de peixes capturadas no estuário do Rio Doce tanto antes como depois do rompimento, serão utilizadas análises de variância unifatoriais. Antes das análises os dados serão checados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e transformados se necessário. O fator será o “período de amostragem” e as variáveis dependentes serão

$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Comparações pareadas entre os períodos serão realizadas *a posteriori* com o teste de Tukey, quando houver diferença significativa.

A ecologia trófica (dieta, nutricional e isotópica) das espécies selecionadas no estuário do Rio Doce e nos controles será avaliada mediante índices de amplitude e sobreposição de nicho trófico (e.g., método de Levins e δ -espaço), bem como com modelos lineares, de nicho isotópico e mistura (veja Andrades et al. 2019; Machovsky-Capuska et al. 2020).

6.3.7. Telemetria de peixes estuarinos (Meta 06)

Para definição da área de vida será utilizado o método de Densidade de Kernel (KUD) (WORTON, 1989). Índices de residência (IR) e fidelidade (IF) serão estimados com o intuito de verificar possíveis diferenças na permanência dos indivíduos dentro das áreas de estudo. As análises de distância percorrida e KUD serão realizadas através do website Zoatrack (<https://zoatrack.org>) e do software R (R Core Team, 2017), por meio do pacote AdeHabitatHR. As médias de distância percorrida, KUD50, KUD95, IR e IF serão comparadas entre os Rios Doce e São Mateus através do teste de *Mann-Whitney*.

Para avaliar o efeito dos fatores abióticos sobre a presença e ausência dos robalos na foz do Rio Doce, serão utilizados Modelos Aditivos Generalizados Mistos (GAMM), implementados com o pacote gamm4 (WOOD AND SCHEIPL, 2020) na linguagem de programação R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2021).

6.3.8. Microquímica de otólitos (Meta 07)

Serão coletados ao menos 30 exemplares adultos de cada espécie selecionada ao longo dos cinco estuários (Itapimirim, Benevente, Piraquê-açu, Doce e São Mateus). Após a coleta, cada exemplar será acondicionado em caixa térmica e levados para laboratório, onde serão medidos (comprimento padrão em centímetros), pesados (gramas), e dissecados para a retirada dos otólitos, que serão limpos de tecidos orgânicos e armazenados em tubos Eppendorf. Posteriormente, os otólitos esquerdos serão emblocados em resina epóxi e cortados transversalmente em lâminas delgadas (200-300 μm) com auxílio de uma cortadeira de precisão. Uma vez prontos os cortes dos otólitos, os mesmos terão sua idade determinada e posteriormente passarão pelo processo de ablação a laser, através de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivo por ablação laser (ICP-MS-LA), para a determinação química de cada otólito analisado. Os elementos, serão analisados através de um transecto entre o núcleo (informações referentes a origem da vida do peixe) e a borda (informações referentes a momentos antes de ser sacrificado) do otólito, que mostrará a concentração de cada elemento ao longo da vida de cada espécie.

6.3.9. Estudo de larvas estuarinas (Meta 08)

O efeito do impacto sobre os dados de abundância, biomassa, tamanho médio, riqueza, diversidade e índices de diversidade α da assembleia de pós-larvas de peixes para os fatores Impacto (I vs C) e Ano será avaliado através de PERMANOVA. Para visualizar as diferenças na composição e abundância de espécies (taxa) de pós-larvas de peixes entre as zonas de

monitoramento, foi utilizado o Diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis com os dados de abundância transformados por $\text{Log}(x+1)$. Adicionalmente, os dados ambientais e as espécies (taxa) foram correlacionados as dimensões da ordenação utilizando a função “envfit” do pacote vegan no R. Ainda os índices de diversidade local (α), regional (γ) e entre habitats (β) serão empregados com a finalidade de comparar a riqueza de espécies de peixes recifais entre as zonas estudadas e, o índice de diversidade verdadeira (sensu JONES et al., 2006) que considera que o número efetivo de espécies é equivalente ao número de Hill (qD) (HILL, 1973) onde, a diversidade poder ser quantificada como espécies igualmente abundantes, com base no aumento do peso da abundância pela ordem de diversidade q . Quando q igual a 0 (0D) as abundâncias são desconsideradas, o que favorece a representatividade de espécies raras; quando q é igual a 1(1D) o valor de diversidade gerado equivale a entropia de Shannon e espécies comuns na comunidade têm representação mais efetiva; e quando q é igual a 2 (2D) um peso desproporcional é dado para abundância e as espécies dominantes são mais representativas (JOST, 2007).

6.3.10. Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais (Meta 09)

O efeito do impacto sobre os dados de abundância, biomassa, tamanho médio, riqueza, diversidade e índices de diversidade α da assembleia de peixes recifais para os fatores Impacto (I vs C), Setor e Ano será avaliado através de PERMANOVA, utilizando a matriz de dados abióticos como covariáveis. Adicionalmente a assembleia de peixes recifais foi categorizada segundo grupos tróficos e a abundância e biomassa desses grupos tróficos entre os anos, zonas e setores amostrados serão testados com PERMANOVA. Um Diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) será utilizado para visualizar a similaridade de composição e abundância da ictiofauna entre as amostras obtidas em um espaço bidimensional. E, para entender quais fatores ambientais influenciam a composição de espécies, uma Análise de Redundância (RDA) será feita, usando as variáveis ambientais como preditores e a assembleia de peixes como variável resposta. Ainda os índices de diversidade local (α), regional (γ) e entre habitats (β) serão empregados com a finalidade de comparar a riqueza de espécies de peixes recifais entre as zonas estudadas e, o índice de diversidade verdadeira (sensu JONES et al., 2006) que considera que o número efetivo de espécies é equivalente ao número de Hill (qD) (HILL, 1973) onde, a diversidade poder ser quantificada como espécies igualmente abundantes, com base no aumento do peso da abundância pela ordem de diversidade q . Quando q igual a 0 (0D) as abundâncias são desconsideradas, o que favorece a representatividade de espécies raras; quando q é igual a 1(1D) o valor de diversidade gerado equivale a entropia de Shannon e espécies comuns na comunidade têm representação mais efetiva; e quando q é igual a 2 (2D) um peso desproporcional é dado para abundância e as espécies dominantes são mais representativas (JOST, 2007).

6.3.11. Genética de populações de peixes marinhos/recifais (Meta 10)

Os eletroforegramas serão analisados no programa GeneMapper v.5 (Thermo Fisher Scientific). A matriz de alelos será utilizada para estimar os seguintes parâmetros: riqueza alélica, alelos privados,

heterozigose esperada e observada, desvios do HWE, desequilíbrio de ligação, diversidade genética, Fst, Fis, fluxo gênico, estrutura populacional, gargalos populacionais e teste de Mantel. Para os testes descritos acima serão utilizados os programas FSTAT v.1.2 (GOUDET, 1995), Arlequim 3.01 (EXCOFFIER et al., 2005), Structure.2.2 (PRITCHARD, 2000), Bottleneck (PIRY et al., 1999).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO, M.A.P.M. **Estudos biológicos do *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), camarão sete-barbas (Crustacea, Penaeidae), de Matinhos, Paraná.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1978.

ANDERSON, M.J.; GORLEY, R.N.; CLARKE, K.R. **PERMANOVA for PRIMER: Guide to Software and Statistics Methods.** Plymouth, UK: PRIMER-E, Ltd, 2008. 214p.

ANDERSON, M.J. **Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) in Wiley StatsRef: Statistics Reference Online.** John Wiley and Sons, Ltd., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>.

ANDRADES, R.; ANDRADE, J.M.; JESUS-JUNIOR, P.S.; MACIEIRA, R.M.; BERNARDINO, A.F.; GIARRIZZO, T.; JOYEUX, J. C. **Multiple niche-based analyses reveal the dual life of an intertidal reef predator.** Marine Ecology Progress Series, 2019. v. 624, p. 131-141.

BANDELT, H.J.; FOSTER, P.; ROHL, A. **Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** Molecular Biology and Evolution, 1999. v. 16, p. 37-48.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.** Journal of Fish Diseases, 1999. v. 22, p. 25-34.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** Bioinformatics, 2014. v. 30, n. 15, p. 2114-2120.

BROWN-PETERSON, N.J.; WYANSKY, D.M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B.J.; LOWERRE-BARBIERI, S.K. **A standardized terminology for describing reproductive development in fishes.** Marine and Coastal Fisheries, 2011. v. 3, p. 52-70.

CATCHEN, J.M.; AMORES, A.; HOHENLOHE, P.; CRESKO, W.; POSTLETHWAIT, J. **Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences.** G3 Genes|Genomes|Genetics, 2011. v. 1, n. 3, p. 171-182.

CHAO, A.; COLWELL, R.K.; LIN, C.W.; GOTELLI, N.J. **Sufficient sampling for asymptotic minimum species richness estimators.** Ecology, 2009. v. 90, p. 1125-1133.

CHAO, A.; KUBOTA, Y.; ZELENÝ, D.; CHIU, C.H.; LI, C.F.; KUSUMOTO, B.; YHUHARA, M.; THORN, S.; WEI, C.-L.; COSTELLO, M.J.; COLWELL, R.K. **Quantifying sample completeness and**

comparing diversities among assemblages. Ecological Research, 2009. v. 35, p. 292-314.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N.; SOMERFIELD, P.J.; WARWICK, R.M. **Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation.** Plymouth: PRIMER-E, Ltd. 2014.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. **Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data.** Genetics, 1996. v. 144, n. 4, p. 2001-2014.

DAROS, F.A.; SPACH, H.L.; SIAL, A.N.; CORREIA, A.T. **Otolith fingerprints of the coral reef fish *Stegastes fuscus* in southeast Brazil: a useful tool for population and connectivity studies.** Regional Studies in Marine Science, 2016. v. 3, p. 262-272.

DAROS, F.A.; CONDINI, M.V.; ALTAFIN, J.A.; FERREIRA, F.O.; HOSIM-SILVA, M. Fish otolith microchemistry as a biomarker of the world's largest mining disaster. Science of the Total Environment, 2022. v. 807, p. 151780.

ELSDON, T.S.; WELLS, B.K.; CAMPANA, S.E.; GILLANDERS, B.M.; JONES, C.M.; LIMBURG, K.E.; SECOR, D.H.; THORROLD, S.R.; WALTHER, B.D. Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 2008. v. 46, p. 297-330.

EWELS, P.; MAGNUSSON, M.; LUNDIN, S.; KÄLLER, M. **MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report.** Bioinformatics, 2016. v.32, n. 19, p. 3047-3048.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis.** Evolutionary bioinformatics, 2005. v. 1, p. 47-50.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis'.** Evolutionary Bioinformatics Online, 2010. v. 1, p. 47-50.

FÉLIX-HACKRADT, F.C.; HACKRADT, C.W.; TREVIÑO-OTÓN, J.; PÉREZ-RUZAFÁ, A.; GARCÍA-CHARTON, J.A. **Habitat use and ontogenetic shifts of fish life stages at rocky reefs in South-western Mediterranean Sea.** Journal of Sea Research, 2014. v. 88, p. 67-77.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** Evolution, 1985. v. 39, p. 783-791.

GARCÍA-CHARTON, J.A.; PÉREZ-RUZAFÁ, A. **Spatial pattern and the habitat structure of a Mediterranean rocky reef fish local assemblage.** Marine Biology, 2001. v. 138, p. 917-934.

GLASBY, T.M. **Analyzing data from post-impact studies using asymmetrical analyses of variance: a case study of epibiota on marinas.** Australian Journal of Ecology, 1997. v. 22, p. 448-459.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices.** 2002. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.Htm>.

HACKRADT, C.W.; FÉLIX-HACKRADT, F.C.; GARCÍA-CHARTON, J.A. **Influence of habitat structure on fish assemblage of an artificial reef in southern Brazil.** Marine Environmental Research, 2011. v. 72, p. 235-247.

HARMELIN, J.G. **Structure et variabilité de l'ichtyofaune d'une zone rocheuse protégée en Méditerranée (Parc National de Port-Cros, France).** P. S. Z. N. I. Marine Ecology, 1987. v. 8, n. 3, p. 263-284.

HILL, M.O. **Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences.** Ecology, 1973. v. 54, n. 2, p. 427-432.

HÜSSY, K.; LIMBURG, K.E.; PONTUAL, H.; THOMAS, O.R.B.; COOK, P.K.; HEIMBRAND, Y.; BLASS, M.; STURROK, A.M. **Trace Element Patterns in otoliths: the role of biomineralization.** Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2020. doi: 10.1080/23308249.2020.1760204.

JACKSON, A. L.; INGER, R.; PARNELL, A. C.; BEARHOP, S. **Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER—Stable Isotope Bayesian Ellipses in R.** Journal of Animal Ecology, 2011. v. 80, n. 3, p. 595-602.

JONES, G.P.; MUNDAY, P.L.; CALEY, M.J. **Rarity in Coral Reef Fish Communities.** In. SALE, P. (Ed.) Coral Reef Fishes Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem. London, UK. Academic Press, 2006. p. 81–101.

JOST, L. **Partitioning diversity into independent alpha and beta components.** Ecology, 2007. v. 88, n. 10, p. 2427–2439.

KIMURA, M. **A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** Journal of Molecular Evolution, 1980. v. 16, p. 111–120.

LARA, M.D.B.G. **Estudos preliminares da maturação da gônada do camarão legítimo *Penaeus schmitti*.** Acarpesc Cientific, 1972. v. 1, p. 1-24.

LAYMAN, C.A.; ARRINGTON, D.A.; MONTAÑA, C.G.; POST, D.M. **Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure?** Ecology, 2007. v. 88, n. 1, p. 42-48.

MACHOVSKY-CAPUSKA, G.E.; ANDRADES, R.; SANTOS, R.G. **Debris ingestion and nutritional niches in estuarine and reef green turtles.** Marine Pollution Bulletin, 2020. v. 153, p. 110943.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. **Computer note. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data.** Journal of Heredity, 1999. v. 90, n. 4, p. 502-503.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. **Inference of population structure using multilocus genotype data.** Genetics, 2000. v. 155, p. 945–959.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG N.A.; DONNELLY P. **Association mapping in**

structured populations. American Journal of Human Genetics, 2000. v. 67, p. 170-181.

RODRIGUES, P.P. **Aspectos reprodutivos do robalo peba, *Centropomus parallelus*, na foz do rio doce, Linhares/ES.** Monografia (Graduação em Oceanografia) - Centro de Ciências Humanas e Naturais Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, 2005.

ROZAS, J.P.; LIBRADO, J.C.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, X.; ROZAS, R. **DnaSP version 5.10.1 (Self-extracting file of 4.6 Mb).** Universitat de Barcelona, 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular Biology and Evolution, 1987. v. 4, p. 406-425.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution, 2013. v. 30, p. 2725-2729.

UNDERWOOD, A.J. **Beyond BACI: Experimental designs for detecting human environmental impacts on temporal variations in natural populations.** Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 1991. v. 42, p. 569–587.

UNDERWOOD, A.J. **Beyond BACI: the detection of environmental impacts on populations in the real, but variable, world.** Journal of Experimental marine Biology and Ecology, 1992. v. 161, p. 145-178.

UNDERWOOD, A.J. **On beyond BACI: sampling designs that might reliably detect environmental disturbances.** Ecological Applications, 1994. v. 4, p. 3–15.

UNDERWOOD, A.J. **Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance.** Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 504p.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática.** Co-edição EDUEM/CNPq e NUPELIA. 1996. 169p.

WINGETT, S.; ANDREWS, S. **FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control.** F1000 Research, 2018. Doi. 10.12688/f1000research.15931.2.

WOOD, S.; SCHEIPL, F. **gamm4: Generalized Additive Mixed Models using 'mgcv' and 'lme4'.** R package version 0.2-6. 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=gamm4>

WORTON, B. **Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies.** Ecology, 1989. v. 70, n. 1, p. 164-168.

TARTARUGAS MARINHAS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Sarah Maria Vargas	Coordenadora	UFES
Marcelo Renan de Deus Santos	Pesquisador	IMD
Camila Miguel	Pesquisadora	IMD
Thyara Noely Simões	Pesquisadora	IMD
Laís Amorim Ferreira	Técnica de análises ambientais	UFES
Sandra Ludwig	Pesquisadora	UFES
José Érikson Alves Silva	Pesquisador	UFES
Monique Nascimento	Técnica	UFES
Albert	Bolsista IC	UFES
Paula Rodrigues Lopes Guimarães	Técnica de análises ambientais	UFES

2. ESCOPO

Diversos estudos demonstraram que 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. Este plano de trabalho refere-se ao monitoramento da diversidade genética, estrutura populacional, história demográfica, da saúde e estudo ecotoxicológico de tartarugas marinhas em áreas de desova e alimentação (Foz do Rio Doce, em Linhares, ES, impactadas pelos rejeitos de mineração provenientes do rompimento da barragem de Fundão em Mariana, MG)

O monitoramento permitirá avaliar os níveis de diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das espécies *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* na fase adulta reprodutiva (fêmeas), na foz do Rio Doce. Os indivíduos encontrados durante o período do estudo serão avaliados, bem como, de períodos anteriores para comparações (REIS et al., 2010, VARGAS et al., 2008, VARGAS et al., 2019, DUTTON et al. 2013, NARO-MACIEL et al., 2012 e SHAMBLIN et al., 2014). Indivíduos da espécie *Chelonia mydas* na fase juvenil também serão analisados. O monitoramento também avaliará o impacto da presença de rejeitos de mineração e contaminantes arrastados pelo seu fluxo sobre a saúde de *C. mydas* (na fase juvenil, em área de alimentação), *C. caretta* (nas fases adulta reprodutiva, ovos e filhotes neonatos) e *D. coriacea* (nas fases de ovos e filhotes neonatos) e na eficiência reprodutiva de *C. caretta* e *D. coriacea* na foz do Rio Doce.

Os resultados obtidos pela nossa equipe até o momento têm contribuído para avaliar a resposta das populações de tartarugas frente aos impactos antrópicos na região impactada pelos rejeitos de mineração da barragem de Fundão (RRDM-RT23-2019; RRDM-RT35-RSE2020; RRDM-RT36D-RA2020; RRDM-RT36F-RA2020; RRDM-RT37-RSE2021). Assim, a continuidade do projeto permitirá melhorar nosso entendimento sobre a relação dos níveis de diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica, bem como avaliar o impacto da presença de rejeitos de mineração

e contaminantes arrastados pelo seu fluxo sobre a saúde de *C. mydas* (na fase juvenil), *C. caretta* (nas fases adulta reprodutiva, ovos e filhotes neonatos) e *D. coriacea* (nas fases de ovos e filhotes neonatos), e sobre a eficiência reprodutiva de *C. caretta* e *D. coriacea* na foz do Rio Doce. Uma vez que globalmente o status de conservação dessas espécies de tartarugas segue uma tendência de declínio, transitando entre espécies vulneráveis e ameaçadas de extinção (IUCN 2021 e MMA), estudar os impactos sobre suas populações nas áreas impactadas é de suma importância para conservação das espécies.

As informações que já temos denotam um cenário preocupante quanto à capacidade de resposta das tartarugas-marinhas aos contaminantes presentes na área impactada (RRDM-RT23-2019; RRDM-RT35-RSE2020; RRMD-RT36D-RA2020; RRDM-RT36F-RA2020; RRDM-RT37-RSE2021), pois as populações de tartarugas marinhas avaliadas apresentam baixa diversidade genética independentemente do período/local avaliado, o que significa que são indivíduos com menor resiliência e capacidade de lidar com impactos antrópicos, como é o caso do rompimento da barragem de Fundão (RRDM-RT23-2019; RRDM-RT35-RSE2020; RRMD-RT36D-RA2020; RRDM-RT36F-RA2020; RRDM-RT37-RSE2021). Isso se reflete nas evidências de comprometimento da saúde das tartarugas nas áreas impactadas tanto para *C. caretta*, quanto para *C. mydas*. A situação para *D. coriacea* é ainda mais delicada, pois além de ser uma espécie criticamente ameaçada de extinção no Atlântico Sudoeste, pouquíssimo abundante e possuir na Foz do Rio Doce a única localidade regular de desova no Brasil, ela possui baixa diversidade genética para todos os marcadores genéticos estudados. Diversas correlações significativas foram encontradas entre os metais pesados e parâmetros de saúde, e os dados reprodutivos indicam que os metais estão influenciando no sucesso de incubação, taxa de eclosão, e no tempo de incubação dos ovos na área de influência direta dos rejeitos de mineração na foz do Rio Doce, ES (RRDM-RT23-2019; RRDM-RT35-RSE2020; RRMD-RT36D-RA2020; RRDM-RT36F-RA2020; RRDM-RT37-RSE2021). Além disso, a presença periódica dos rejeitos remobilizados pelas condições oceanográficas e hidrológicas expõem constantemente as tartarugas-verdes da APA Costa das Algas aos metais pesados característicos do rejeito, bem como a outros contaminantes mobilizados pelo seu fluxo, sendo este um dos fatores que, juntamente com os aspectos inerentes à biologia da espécie na fase juvenil, tornam essa região um *hotspot* de ameaças à conservação. Dessa forma, o aumento de metais pesados nos ovos, perdas de ninhos bem como redução da taxa de eclosão, podem interferir diretamente a longo prazo no tamanho populacional censo (N) e no tamanho populacional efetivo (N_e) das populações, consequentemente impactando globalmente a distribuição dessas espécies de tartarugas ameaçadas.

3. OBJETIVO

Monitorar e comparar com dados anteriores, a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de tartarugas marinhas em áreas de desova e alimentação na região de estudo (Figura 14 e Tabela 4).

Avaliar o efeito da presença de contaminantes sobre a saúde das tartarugas marinhas e sua eficiência reprodutiva.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Avaliação da diversidade genética e dos parâmetros genéticos-populacionais das tartarugas marinhas

Determinar, monitorar e comparar os valores de diversidade genética, a estrutura genético-populacional e a história demográfica das populações de tartarugas marinhas em áreas de desova (*D. coriacea* e *C. caretta*) e alimentação (*C. mydas*) na região de estudo, antes (quando possível) e após o rompimento da barragem.

META 2 – Avaliação da saúde das tartarugas marinhas

Avaliar se a presença de contaminantes no organismo das tartarugas juvenis (*C. mydas*) e adultas (*C. caretta*) estão afetando os parâmetros clínico-laboratoriais de saúde da população a curto, médio e longo prazo e se há transmissão vertical de contaminantes (da fêmea para ovos e filhotes) em *C. caretta*, além de observar o efeito dos níveis de contaminantes sobre o sucesso de eclosão dos ninhos durante a temporada reprodutiva de *D. coriacea* e *C. caretta*.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Parâmetros para avaliação da diversidade genética, estrutura genético-populacional e história demográfica: - dados sobre a quantificação do DNA extraído das amostras - dados sobre a amplificação da região do DNA mitocondrial - dados de sequências do DNA mitocondrial - dados de genótipos dos 15 marcadores nucleares - Parâmetros biométricos e de condição corporal - Prevalência de fibropapilomatose - Parâmetros hematológicos e bioquímicos - Níveis de contaminantes em ovos e filhotes, juvenis e adultos - Dados reprodutivos a serem disponibilizados pelo centro TAMAR/ICMBio	Sarah Maria Vargas Marcelo Renan de Deus Santos Camila Miguel

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 23º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- Determinação dos índices de diversidade (diversidades haplotípicas e nucleotídicas, riqueza alélica, número de alelos, heterozigosidades observadas e esperadas, etc), da estrutura genético-populacional (Fst, Rst, k-clusters, etc) e história demográfica (número efetivo populacional - Ne). - Determinação da condição de saúde das tartarugas marinhas baseado na análise clínico-laboratorial. - Avaliação dos níveis de contaminantes nas tartarugas marinhas e correlação com dados clínico-laboratoriais, de prevalência de fibropapilomatose e de eficiência reprodutiva.	Sarah Maria Vargas Marcelo Renan de Deus Santos Camila Miguel

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

A coleta do material biológico para o monitoramento da genética e saúde das tartarugas marinhas será feito em áreas de desova (para *C. caretta* e *D. coriacea*) e alimentação (*C. mydas*) ao redor da foz do Rio Doce e plataforma continental adjacente, e em áreas controle (Figura 14, Figura 15 e Tabela 4).

As campanhas durante o período de reprodução das tartarugas (entre setembro e março) serão feitas anualmente, ao longo de 4 meses consecutivos e as campanhas embarcadas, para coleta de animais em áreas de alimentação, serão feitas semestralmente (período seco e chuvoso).

Figura 14: Mapa com localização das áreas e estações de monitoramento, do Ambiente Costeiro, tema Megafauna - Tartarugas Marinhas. Legenda: AR= Arembepe; CB=Comboios; CV=Coroa Vermelha; PF = Praia do Forte; PV=Povoação; SC=Santa Cruz; I=Inicial; F=Final.

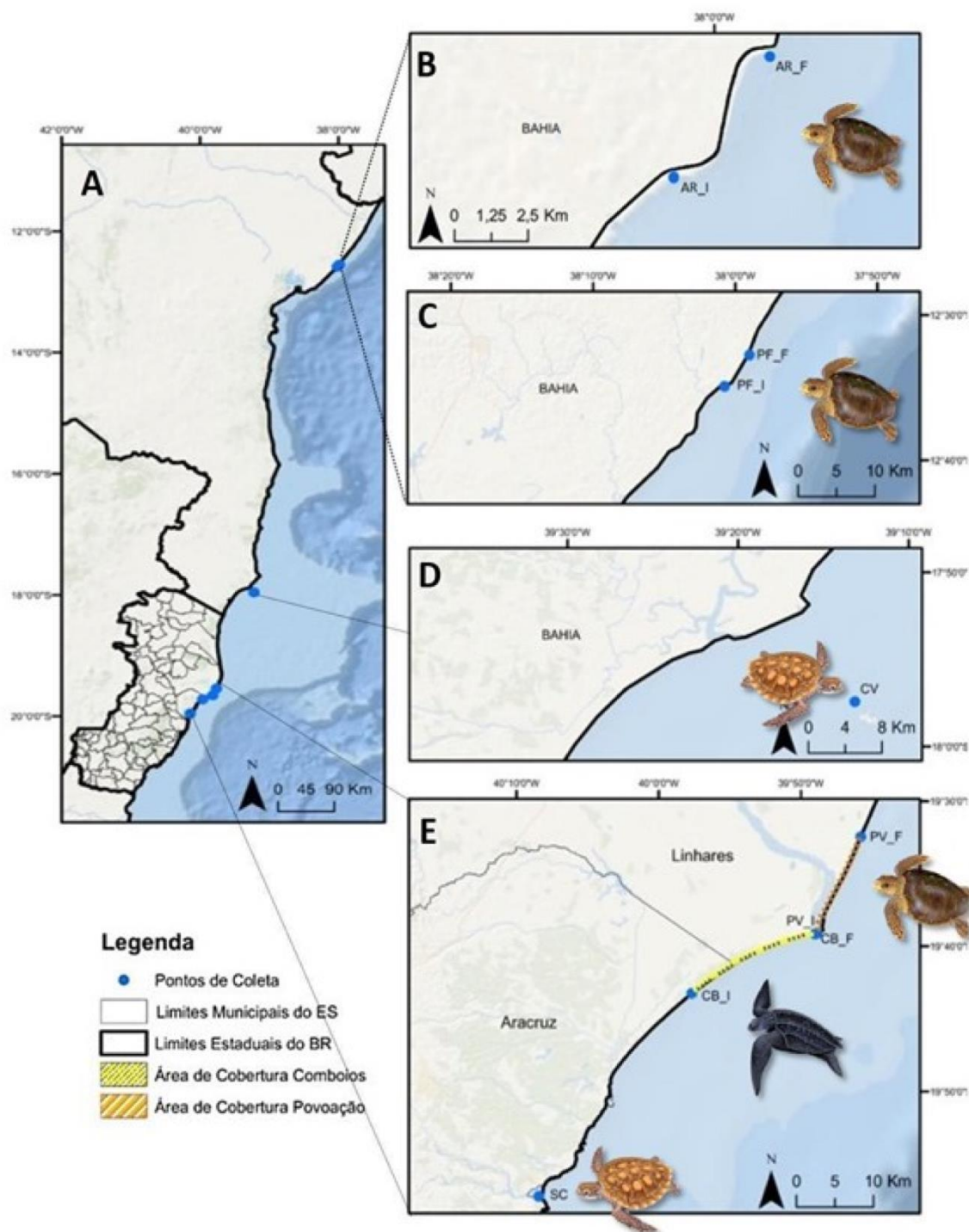


Figura 15: Tartarugas marinhas monitoradas na área de estudo. (A) *Caretta caretta*; (B) *Chelonia mydas*; (C) *Dermochelys coriacea*.



Tabela 4: Malha amostral para o Monitoramento da diversidade genética, dos parâmetros genético-populacionais e da saúde das espécies de tartarugas marinhas associadas à Foz do Rio Doce, plataforma continental e áreas protegidas adjacentes.

Código	População	Localidade/Município/Estado
PV	Afetada	Povoação, Linhares, ES
CB	Afetada	Comboios, Regência, Linhares, ES
PF	Controle	Praia do Forte, Mata de São João, BA
AR	Controle	Arembepe, Camaçari, BA
SC	Afetada	Santa Cruz, Aracruz, ES
CV	Controle	Coroa Vermelha, Nova Viçosa, BA

Tabela 5: Número e tipo de amostras que serão coletadas nas áreas impactadas pelos rejeitos e nas áreas controle.

Linhares, ES			
Espécie	Amostra	Número de amostras por temporada	Número total de amostras (23 meses)
<i>C. caretta</i>	Sangue	60	120
	Carapaça	60	120
	Ovo	180 (60 x 3)	360
	Ovo não eclodido	120 (60 x 2)	240
	Natimortos	60	120
<i>D. coriacea</i>	Tecido (genética)	60	120
	Ovo	45 (15 x 3)	90
	Ovo não eclodido	30 (15 x 2)	60
	Natimortos	15	30
	Tecido (genética)	20	40
Área Controle (Bahia)			
Espécie	Amostra	Número de amostras por temporada	Número total de amostras (23 meses)
<i>C. caretta</i>	Sangue	60	120
	Carapaça	60	120
	Ovo	180 (60 x 3)	360
	Ovo não eclodido	120 (60 x 2)	240
	Natimortos	60	120
	Tecido (genética)	60	120
Santa Cruz, Aracruz, ES			
Espécie	Amostra	Número de amostras por ano	Número total de amostras (23 meses)
<i>C. mydas</i>	Sangue	90	180
	Tecido (genética)	90	180
Área Controle (Coroa Vermelha, BA)			
Espécie	Amostra	Número de amostras por ano	Número total de amostras (23 meses)
<i>C. mydas</i>	Sangue	90	180
	Tecido (genética)	90	180
TOTAL DE AMOSTRAS EM 23 MESES			3100

6.2. Meta 1- Avaliação da diversidade genética e dos parâmetros genéticos-populacionais das tartarugas marinhas

Serão utilizadas amostras de tecidos de tartarugas marinhas encontrados em áreas de desova ou alimentação na costa do Espírito Santo e em áreas controle (Figura 14 e Tabela 4). Serão avaliados os indivíduos encontrados durante o período do estudo, bem como, de períodos anteriores para comparações (REIS et al. 2010, VARGAS et al. 2008, VARGAS et al. 2019 e SHAMBLIN et al. 2014). Os tecidos para as análises genéticas serão armazenados em microtubos e conservados em álcool 98%. Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade e no Laboratório de Genética e Evolução Molecular, do CCHN (Vitória), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

6.2.1. Análises laboratoriais

Um pequeno pedaço de músculo será picotado e colocado em um microtubo no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações, será realizada a extração do DNA pelo método de solução salina (BRUFORD et al.,1992) e CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1987). Ao final do processo o DNA será ressuspensionado com a adição de 20 µL de ddH₂O e armazenado na geladeira a 4°C. As amostras de

DNA serão quantificadas em espectrofotômetro.

Serão utilizados dois tipos de marcadores moleculares para avaliar o padrão de diversidade e estrutura genético-populacional das tartarugas marinhas em nosso estudo: a região controle do DNA mitocondrial e microssatélites do DNA nuclear.

Os DNAs extraídos das amostras de cada indivíduo coletado serão amplificados por PCRs (Reação de Polimerase em Cadeia) para posterior sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (DNAMt) e genotipagem dos microssatélites.

Para amplificação das sequências serão utilizados os primers LCM e H950 (ABREU-GROBOIS et al., 2006) para as três espécies de tartarugas marinhas: *C. caretta*, *C. mydas* e *D. coriacea*. Os produtos de PCR serão observados em gel de agarose de 1% por eletroforese, posteriormente seguidos de três etapas: 1) purificação através da enzima ExoSAP-IT, 2) reação de sequenciamento e 3) precipitação das amostras, onde serão executadas as etapas de limpeza e remoção de excesso de reagentes que pudessem inibir a leitura da sequência. O sequenciamento ocorrerá para ambas as direções (*forward* e *reverse*) em sequenciador ABI Prism 3500.

A amplificação dos *loci* microssatélites será realizada de acordo com os dados da literatura e serão específicos para cada espécie (SHAMBLIN et al., 2009, FITZSIMMONS, 1995, KICHLER et al., 1999, SHAMBLIN et al., 2007, MONZÓN-ARGUELLO et al., 2008, DUTTON & FREY, 2009, RODEN & DUTTON, 2011, ALSTAD, 2011).

Os *loci* microssatélites gerados serão visualizados e identificados com o software GeneMapper 4.1®.

No primeiro ano do novo ciclo será testada uma nova metodologia para obtenção de dados genômicos com intuito de reduzir os custos e aumentar o poder e cobertura das análises genéticas, em substituição à genotipagem dos 15 marcadores nucleares microssatélites para as três espécies de tartarugas marinhas estudadas. Caso essa nova metodologia seja adequada, iremos sugerir a substituição.

6.2.2. Análises de bioinformática e estatísticas

As sequências da região controle do DNA mitocondrial serão alinhadas no programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018). A identificação do haplótipo de cada indivíduo sequenciado será feita no programa DNAsp v6 (ROZAS et al., 2003) comparando as sequências geradas com os haplótipos já publicados para cada uma das espécies analisadas.

Serão estimados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa Arlequin 3.5.2. (EXCOFFIER & LISCHER, 2015), baseada no F_{ST} com 1000 permutações. As redes de haplótipos serão construídas com cálculos de *Median Joining* no programa PopART (LEIGH & BRYANT, 2015).

Para os marcadores microssatélites, múltiplos parâmetros de diversidade genética serão calculados através do programa GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012) sendo, número de alelos por loco (N_a), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A estimativa de riqueza alélica (A_r) será calculada usando o pacote PopGenReport para R

(ADAMACK e GRUBER, 2014). A identidade individual será estimada pelo programa COLONY 2.0 (JONES & WANG, 2010), através do método de máxima verossimilhança e o cálculo de probabilidade de identidade (PI) no programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A análise de alelos raros será realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Já o número populacional efetivo (N_e) será calculado utilizando o método de Desequilíbrio de Ligação (DL) realizado por meio do programa NeEstimator 2.1 (DO et al., 2014).

Para determinar a existência ou não de mudanças na composição e variação genética bem como avaliar os níveis de estrutura populacional, serão realizadas comparações par-a-par entre as amostras pré e pós rompimento da barragem e entre as áreas impactadas e não-impactadas, para ambos marcadores moleculares (DNAm e *loci* microssatélites). Adicionalmente, utilizando somente os dados de microssatélites, será realizado um método de agrupamento por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) disponível no pacote adegenet 2.1 para R (Jombart 2008), que inferem o número de padrões genéticos (K) utilizando um Critério de Inferência Bayesiana (BIC), bem como estimam proporções de mistura entre as populações/origem geográfica (Jombart et al. 2010) traçando uma probabilidade de agrupamento (0-100%), comparando as áreas e períodos. E, complementarmente, será realizada uma Análise de Componentes Principais (PCoA) no GenAlex com o intuito de identificar a variação genética dos indivíduos de acordo com suas populações, revelando assim o maior nível de diferenciação entre eles.

6.3. Meta 2- Avaliação da saúde das tartarugas marinhas

6.3.1. Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *C. caretta* e *D. coriacea*

O monitoramento das tartarugas-marinhas em área de nidificação será realizado na Foz do Rio Doce durante as temporadas reprodutivas em Linhares, ES. Área controle será a Praia do Forte ou Arembepe (BA).

As praias serão monitoradas com veículo com tração 4x4 das 20 às 4h em busca de fêmeas em desova. Após a postura dos ovos, todos os animais serão devidamente contidos por meio da contenção física para tomada de dados biométricos e coleta de material biológico necessário para o desenvolvimento do trabalho (sangue, carapaça e ovos).

Serão tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Os animais capturados serão identificados nas nadadeiras anteriores com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and TagCo.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Os ovos serão coletados no momento da desova (sendo 3 por ninho de *C. caretta*, e de *D. coriacea*) sem contato com o solo, que serão armazenados congelados a -80°C em sacolas plásticas. O ninho

será georreferenciado e monitorado para que os ovos não eclodidos e os filhotes natimortos (aproximadamente 3 por ninho) sejam coletados após a eclosão e armazenados congelados em sacolas plásticas a -80°C (SAKAI et al., 1995; ROE et al., 2011). O monitoramento dos ninhos e coleta de ovos não eclodidos e filhotes natimortos será realizado em conjunto com a equipe do Projeto TAMAR que também obterá os dados reprodutivos.

Serão coletadas amostras de sangue e de carapaça de *Caretta caretta* ao longo da temporada reprodutiva em cada área (Linhares e área controle). Não serão coletadas amostras sanguíneas de *D. coriacea* devido à dificuldade de obtenção e o estresse excessivo dos animais. As amostras sanguíneas serão centrifugadas para obtenção de plasma e soro, que serão congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Amostras sanguíneas serão coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 40 x 1,2 mm e seringas descartáveis, obtendo-se um volume de 10 mL, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo (SANTOS et al., 2015). Imediatamente após a coleta, será realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras serão fracionadas em tubos contendo heparina sódica e próprios para análises de elementos traço e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime será destinada a realização do hemograma e o restante será centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras serão estocadas em ultra congelador a -84°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo. As amostras de carapaça serão coletadas através da remoção de lascas da cutícula do casco, as quais serão armazenadas a -80°C até posterior análise.

6.3.2. Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *C. mydas*

Serão realizadas 2 campanhas de captura de *Chelonia mydas* juvenis na APA Costa das Algas em Santa Cruz, próximo à foz do rio Piraquê-açu, Aracruz, ES e 2 campanhas no Recife de Coroa Vermelha – BA. Por ano serão capturados 90 indivíduos em cada área de alimentação, portanto serão 180 amostras de sangue. A captura de *Chelonia mydas* juvenis será por busca ativa ou com uso de rede de espera de nylon com malha de 8 cm, 6 metros de largura e 200m de comprimento (SANTOS, 2005). A rede será lançada a partir de um barco motorizado e fixada ao fundo com âncora a uma distância de 30 a 200 metros da praia. Após armada, a rede será monitorada continuamente para evitar lesões nos animais que forem capturados. O tempo de esforço será de 4 a 6 horas diárias a depender das condições climáticas e oceanográficas.

Após serem capturadas, serão tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também será obtida a massa de juvenis de *C. mydas* com uso de dinamômetro digital com capacidade para 50Kg com escala mínima de 0,1g. Os animais capturados serão identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na

qual cada animal recebe uma numeração única. Amostras sanguíneas serão coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 25 x 0,7 mm em juvenis e seringas descartáveis, obtendo-se um volume entre 3 e 30 mL de acordo com o tamanho dos animais, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo (SANTOS et al., 2015). Imediatamente após a coleta, será realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras serão fracionadas em tubos contendo heparina lítica e próprios para análises de elementos traços e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime será destinada a realização do hemograma e o restante será centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras serão estocadas em ultra congelador a -84°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo.

6.3.3. Métodos de determinação e análise dos parâmetros de interesse para o monitoramento

Hemograma: Os hemogramas serão realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) será realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm em centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos (Tr) será realizada em câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) será feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da reação para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 µl de sangue total com 2,5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540nm (SANTOS et al., 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias será realizado o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (THRALL et al., 2004). A contagem diferencial dos leucócitos será feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido®. Serão contadas 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al., 2009).

Análises bioquímicas: Será analisado um perfil bioquímico plasmático de 20 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartatoaminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises serão realizadas no sistema automatizado BeckmanCoulter AU2700, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al., 2015).

Análises de elementos traço: A dosagem de elementos traço será realizada por GF-AAS ou equipamento disponível no laboratório contratado pela FEST, após a validação pela equipe da compatibilidade com os resultados anteriores. As amostras de ovos (3 por ninho), serão separadas em pool de casca, gema e clara, já os ovos não eclodidos (3 por ninho) serão separados em pool de conteúdo e casca. Os natimortos serão analisados em pool de 3 filhotes por ninho.

É necessário a realização das análises em duplicata para confirmação dos resultados a partir da repetição da análise. Através dela validamos e avaliamos a precisão dos resultados. Desse modo, é

possível a verificação instantânea de que o resultado está dentro dos padrões. As duplicatas são importantes principalmente para amostras que são mais difíceis de serem homogeneizadas, como os natimortos e os ovos.

As amostras serão preparadas por digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a quente (CAMACHO et al., 2013c). Os metais analisados serão: As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn.

Avaliação do Sucesso Reprodutivo: Para avaliar a relação entre os contaminantes e o sucesso reprodutivo será necessário aguardar a eclosão dos filhotes (aproximadamente 60 dias). O sucesso reprodutivo é medido pela taxa de sucesso de eclosão e emersão. Após este período os ninhos serão abertos e contabilizados o número de ovos não eclodidos, cascas, filhotes natimortos e filhotes retidos. Ninhos com maior quantidade proporcional de cascas e filhotes viáveis apresentarão maior sucesso reprodutivo dado em percentual de nascidos. Também será calculado o percentual de natimortos e ovos inviáveis. Esses dados deverão ser obtidos junto ao Projeto TAMAR/ICMBio.

Análises estatísticas: os valores bioquímicos e de contaminantes serão analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilks. Grupos de dados com distribuição normal serão comparados (por exemplo local, temporada reprodutiva) por ANOVA (soma dos quadrados tipo IV) com teste de Games-Howell post-hoc, ou por ANOVA não paramétrica com teste de Mann-Whitney post-hoc se não forem normais. Correlações de Spearman e PCA serão utilizadas para verificar se há correlação entre parâmetros bioquímicos e as concentrações de contaminantes. Os níveis de contaminantes serão comparados entre tartarugas na primeira desova e as posteriores por anova de medidas repetidas. A avaliação do sucesso de eclosão com os contaminantes nos ovos, filhotes e tartarugas será avaliada por modelo linear generalizado. Todas as análises estatísticas serão feitas com significância de $<0,05$ usando o pacote IBM SPSS 17.0.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-GROBOIS, F. A.; HORROCKS, J. A.; FORMIA, A.; DUTTON, P.; LEROUX, R.; VÉLEZ-ZUAZO, X.; SOARES, L.; MEYLAN, P. NEW MTDNA DLOOP PRIMERS WHICH WORK FOR A VARIETY OF MARINE TURTLE SPECIES MAY INCREASE THE RESOLUTION OF MIXED STOCK ANALYSIS. FRICK, M.; PANAGOPOULOU, A.; REES, A. F. & WILLIAMS, K. (COMPS.). PROCEEDINGS OF THE 26TH ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY BOOK OF ABSTRACTS. ISLAND OF CRETE, GREECE: ISTS 179, 2006.

ADAMACK, A. T., & GRUBER, B. POPGENREPORT: SIMPLIFYING BASIC POPULATION GENETIC ANALYSES IN R. METHODS IN ECOLOGY AND EVOLUTION, 5(4), 384-387.

ALSTAD, T. I.; SHAMBLIN, B. M.; BAGLEY, D. A.; EHRHART, L. M.; NAIRN, C. J. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TETRANUCLEOTIDE MICROSATELLITES FROM THE LEATHERBACK TURTLE (DERMOCHELYS CORIACEA). CONSERVATION GENETIC RESOURCES V. 3, P. 457-460, 2011.

BRUFORD, M. W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J. F. Y, BURKE, T. Single-locus and DNA

fingerprinting. In: Hoelzel A. R. (ed). Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach, IRL Press, Oxford, p. 225-269, 1992.

CAMACHO, M.; BOADA, L. D.; ORÓS, J.; CALABUIG, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. P. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Marine pollution bulletin, v. 64, n. 9, p. 1974–80, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748504>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

CAMACHO, M.; LUZARDO, O. P.; BOADA, L. D.; LÓPEZ JURADO, L. F.; MEDINA, M.; ZUMBADO, M.; ORÓS, J. Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles. The Science of the total environment, v. 458–460, p. 283–9, 1 ago. 2013a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665416>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

CAMACHO, M.; ORÓS, J.; BOADA, L. D.; ZACCARONI, A.; SILVI, M.; FORMIGARO, C.; LÓPEZ, P.; ZUMBADO, M.; LUZARDO, O. P. Potential adverse effects of inorganic pollutants on clinical parameters of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Results from a nesting colony from Cape Verde, West Africa. Marine Environmental Research, v. 92, p. 15–22, 1 dez. 2013b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665416>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

DO, C., WAPLES, R. S., PEEL, D., MACBETH, G. M., TILLET, B. J., & OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. Molecular ecology resources, 14(1), 209-214. 2014.

DOYLE J. J., DOYLE J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUTTON, P. H.; FREY, A. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). Molecular Ecology Resources, v. 9, p. 354-356, 2009.

DUTTON, P. H.; RODEN, S. E.; STEWART, K. R.; LACASELLA, E.; TIWARI, M.; FORMIA, A.; THOMÉ, J. C.; LIVINGSTONE, S. R.; ECKERT, E.; CHACON-CHAVERRI, D.; RIVALAN, P.; ALLMAN, P. Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. Conservation Genetics 14, 625-636, 2013.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. Arlequin 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics, 2015.

FITZSIMMONS N. N.; MORITZ, C.; MOORE, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. Molecular Biology and Evolution, v. 12: p. 432-440, 1995.

JOMBART T, DEVILLAR S & BALLOUX F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. BCM Genetics 11:94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>. 2010.

- JONES O & WANG J. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol* 10:551-555. 2010.
- KALINOWSKI, S. T. Hp-Rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 187-189, 2005.
- KICHLER, K.; HOLDER, M. T.; DAVIS, S. K.; MÁRQUEZ-M., R.; OWENS, D. W. Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 819-830, 1999.
- KOMOROSKE, L. M. et al. Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere*, v. 84, n. 5, p. 544-552, 2011.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolutionary*, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 6, p. 1110-1116, 2015.
- MONZÓN-ARGUELLO, C.; MUÑOZ, J.; MARCO, A.; LÓPEZ-JURADO, L. F.; RICO, C. Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. *Conservation Genetics*, v. 9, p. 1045-1049, 2008.
- NARO-MACIEL, E.; BONDIOLI, A. C. V.; MARTIN, M.; ALMEIDA, A. P.A.; BAPTISTOTTE, C.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M. A.; SANTOS, A. J. B.; AMATO, G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: a focus on the southwestern Atlantic. *Journal of Heredity*, v. 103, p. 792-805, 2012.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, v. 28, p. 2537-2539, 2012.
- REIS, E. C, SOARES, L. S, VARGAS, S. M, SANTOS, F. R, YOUNG, R. J, BJORNDALE, K. A., BOLTON, A. B., LÔBO-HAJDU. G. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics* 11, 1467-1477, 2010.
- RODEN, S. E.; DUTTON, P. H. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and crossspecies amplification. *Conservation Genetics Resources*, v. 3, p. 49-52, 2011.
- ROE, J. H.; SILL, N. S.; COLUMBIA, M. R.; PALADINO, F. V. Trace Metals in Eggs and Hatchlings of Pacific Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) Nesting at Playa Grande, Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 10, n. 1, p. 3-9, 2011.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v. 19, p. 2496-2497, 2003.
- RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual – Anexo 6 Megafauna. RT-23, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 531 pag. 2019.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Semestral de Evolução (RSE). RT-35, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1070 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Ambiente Marinho. RT-36D, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1600 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Matriz de Resultados Ambientes Dulcícola, Costeiro e Marinho. RT-36F, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 50 pag. 2020.

RRDM, Rede Rio Doce Mar, Relatório Semestral de Evolução (RSE). RT-37, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 143 pag. 2021.

SAKAI, H.; ICHIHASHI, H.; SUGANUMA, H.; TATSUKAWA, R. Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. *Marine Pollution Bulletin*, v. 30, n. 5, p. 347–353, maio 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0025326X9400185C>>.

SANTOS, M. R. de D. Parâmetros bioquímicos, hematócrito e condição corporal no monitoramento da saúde de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens no Espírito Santo, Brasil. 2005. Universidade Federal do Espírito Santo, 2005.

SANTOS, M. R. de D.; FERREIRA, L. S.; BAPTISTOTTE, C.; GROSSMAN, A.; BELLINI, C. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal science*, v. 46, n. 6, p. 491–499, 2009.

SANTOS, M. R. de D.; SILVA MARTINS, A.; BAPTISTOTTE, C.; WORK, T. M. Health condition of juvenile *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 115, n. 3, p. 193–201, 20 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/dao/v115/n3/p193-201/>>.

SHAMBLIN, B. M.; FAIRCLOTH, B. C.; DODD, M.; WOOD-JONES, A. L.; CASTLEBERRY, S. B.; CARROLL, J. P.; NAIRN, C. J. Tetranucleotide microsatellites from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology Resources*, v. 7, p. 784-787, 2007.

SHAMBLIN, B. M.; FAIRCLOTH, B. C.; DODD, M. G.; BAGLEY, D. A.; EHRHART, L. M.; DUTTON, P. H.; FREY, A.; NAIRN, C. J. Tetranucleotide markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Conservation Genetics*, v. 10, p. 577-580, 2009.

SHAMBLIN, BM, AB BOLTEN, FA ABREU-GROBOIS, KA BJORNDAL, L CARDONA, C CARRERAS, M CLUSA et al. 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. doi:10.1371/journal.pone.0085956. 2014.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. W. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.

VARGAS SM, ARAUJO FCF, MONTEIRO DS, ESTIMA CE, ALMEIDA AP, SOARES LS, SANTOS F. Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. Journal of Heredity, 99(2): 215-220. 2008.

VARGAS, S. M.; LINS, L. S. F.; MOLFETTI, É.; HO, S. Y. W.; MONTEIRO, D.; BARRETO, J.; COLMAN, L.; VILA-VERDE, L.; BAPTISTOTTE, C.; THOMÉ, J. C. A.; SANTOS, F. R. Revisiting the genetic diversity and population structure of the critically endangered leatherback turtles in the South-west Atlantic Ocean: insights for species conservation. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 99, 31-41, 2019.

CETÁCEOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dra. Ana Paula Cazerta Farro	Coordenadora do projeto Cetáceos e Pesquisador responsável	CEUNES/UFES
Dr. Leonardo Serafim da Silveira	Pesquisador responsável	UENF
Dr. José Lailson Brito Jr.	Pesquisador responsável	UERJ
Dr. Alexandre de Freitas Azevedo	Pesquisador responsável	UERJ
Dra. Tatiana Lemos Bisi	Pesquisador responsável	UERJ
Dra. Haydée Andrade Cunha	Pesquisador	UERJ
Lupércio Barbosa	Pesquisador	ORCA
Adriana Castaldo Colosio	Pesquisador	IBJ

2. ESCOPO

Os grandes vertebrados marinhos como mamíferos, tartarugas e aves têm sido reconhecidos como bons organismos bioindicadores das condições e dos impactos no meio ambiente. Por serem animais frequentemente no topo da cadeia alimentar, representam bem diversos contaminantes do ecossistema, os quais bioacumulam ou biomagnificam ao longo da cadeia trófica. Adicionalmente, são animais de fácil visualização e identificação, além de possuírem grande mobilidade, servindo assim como amostradores de áreas maiores do ambiente, além de responderem rapidamente a impactos através da mudança de comportamento ou de áreas utilizadas para alimentação e reprodução.

Diversos estudos têm mostrado que 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 entendimento dos padrões de uso e deslocamento em áreas possivelmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce é de fundamental importância para a aplicação de ações mitigadoras, caso sejam detectadas ameaças a essas espécies em áreas com maior grau de impacto.

Os vertebrados marinhos podem ainda ser utilizados como amostradores do ambiente, sendo possível identificar áreas importantes para a alimentação das espécies, áreas usadas mais intensamente e ainda inferir mudanças no comportamento alimentar ocorridas devido a mudanças nas condições bióticas e abióticas, bem como impactos antrópicos em suas áreas de uso.

O monitoramento dos encalhes de cetáceos, bem como a coleta e estudo sistemático de tecidos para análises genéticas, de contaminantes, de parâmetros biológicos como idade e maturação sexual, 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.

O número de populações, o tamanho destas, bem como, a diversidade genética de cada uma delas no litoral do Espírito Santo podem influenciar no efeito causado por um impacto ambiental intenso, que pode ser extinções locais, ou até mesmo extinção da espécie em casos extremos. Níveis moderados a elevados de variabilidade geralmente conferem maior probabilidade de sobrevivência de uma população a médio e longo prazos (Frankham et al. 2002). Em espécies ameaçadas, as populações apresentam-se reduzidas e muitas vezes isoladas, o que pode levar a uma consequente perda de variabilidade pela redução do fluxo gênico (Frankham et al. 2002). Desta forma, torna-se importante buscar a manutenção dos níveis de variabilidade das populações. Adicionalmente, a partir da variabilidade genética intrapopulacional é possível estimar o tamanho populacional efetivo, tanto ao longo da história evolutiva daquela população quanto no passado mais recente (últimas gerações, também chamado “contemporâneo”); analisar flutuações demográficas ao longo do tempo; testar cenários de expansão ou de contração populacional.

A mensuração das razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) tem sido uma importante ferramenta para estudos da ecologia trófica e uso de área de cetáceos (e.g.: Bisi et al., 2012a, b; 2013). O método se baseia no princípio de que a composição isotópica do predador reflete aquela das suas presas de maneira previsível, referente a uma dieta integrada ao longo do tempo (Michener & Kaufman, 2007). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ traçam a fonte primária de carbono na base da teia alimentar, possibilitando investigar área de forrageamento e variações geográficas no uso de área (Michener & Kaufman, 2007). Já os resultados de $\delta^{15}\text{N}$ permitem entender as relações tróficas e acessar o nível trófico de um organismo (Bisi et al., 2012a; Michener & Kaufman, 2007).

Outra informação importante para compreensão dos impactos a que uma população está exposta é a determinação das concentrações de contaminantes nos tecidos dos animais, como elementos-traço (Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As), organoclorados (PCBs e pesticidas clorados) organobromados (PBDEs), pois há evidências de que altas concentrações desses poluentes podem causar efeitos deletérios neurológicos, endócrinos, imunológicos e promotores de câncer (Who 1993, Gregory & Cyr 2000, Reijnders 2000, ATSDR 2002). Concentrações de alguns desses contaminantes já foram determinadas nas toninhas ao longo da sua distribuição, revelando um quadro preocupante de contaminação (e.g.: Lailson-Brito et al. 2011, Alonso et al. 2012, Dorneles et al. 2013; Manhães et al. 2022; De Oliveira-Ferreira et al., 2022).

Além da possibilidade de algum tipo de doença ou efeito de contaminação promover os encalhes e/ou morte dos cetáceos, no litoral brasileiro a toninha e boto-cinza apresentam um alto índice de captura incidental nas atividades pesqueiras, o que provoca uma alta mortalidade e encalhe desses animais durante todo o ano. Com o rompimento do rio Doce este índice de mortalidade e encalhe pode aumentar, já que as interações com as atividades pesqueiras poderiam ser intensificadas com a diminuição de recursos e busca por esses animais de novas áreas de alimentação.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral:

Dar continuidade ao Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área Ambiental I (PMBA), para o Ambiente Marinho, tema Megafauna, projeto Monitoramento de Cetáceos, visando uma avaliação evolutiva das consequências do aporte de rejeito de mineração, oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana, MG) nos ecossistemas aquáticos e na biodiversidade associada.

Objetivos Específicos

1. Monitorar os encalhes de cetáceos nas praias do litoral do ES, realizar necropsias para quando possível determinar a causa da morte, e coletar amostras biológicas para as análises laboratoriais previstas na proposta; Priorizar coletas e registros dos encalhes de odontocetos.
2. Determinar e monitorar a diversidade genética e parâmetros populacionais de odontocetos, priorizando os botos-cinzas (*Sotalia guianensis*) e toninhas (*Pontoporia blainvillei*) no litoral do ES.
3. Monitorar e analisar as alterações histopatológicas/ósseas e os patógenos encontrados nos cetáceos encalhados nas da área de estudo. Priorização das análises para espécies de odontocetos mais frequentes e ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*);
4. Monitorar a evolução das concentrações de contaminantes em tecidos de cetáceos encalhados na área de estudo. Priorização das análises para espécies de odontocetos mais frequentes e ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*);
5. Estimar a idade e a maturação dos cetáceos encontrados mortos nas praias do litoral do ES. Priorização das análises para espécies de odontocetos mais frequentes e ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*);
6. Descrever a ecologia trófica de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* encontrados mortos nas praias do litoral do Espírito Santo a partir da análise de isótopos estáveis de carbono e de nitrogênio.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 - Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo

Atender encalhes de cetáceos nas praias através de acionamento irregular ou sistemático da população, por parceiros institucionais, como a empresa executora do Programa de Monitoramento de Praia da Bacia de Campos e Espírito Santo financiado pela Petrobrás, que trabalha em cooperação técnica com a REMAB (Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Brasil). Os cetáceos são animais de topo de cadeia trófica e, conseqüentemente, são bons indicadores de saúde ambiental. Dados de encalhes e suas análises

biológicas servem como parâmetros para ações de conservação das espécies envolvidas e em seu ecossistema como um todo, inclusive com impactos de saúde pública, uma vez que problemas que estejam afetando a saúde destes animais, como altos níveis de contaminantes, pode também afetar o pescado que é consumido pelas pessoas.

Pesquisadores responsáveis: Lupércio Barbosa, Adriana Castaldo Colosio.

META 2 - Diversidade genética de cetáceos

Determinar e monitorar a diversidade genética e o fluxo gênico de populações de odontocetos, priorizando os botos-cinzas (*Sotalia guianensis*) e toninhas (*Pontoporia blainvillei*) no litoral do ES. Níveis moderados a elevados de variabilidade geralmente conferem maior probabilidade de sobrevivência de uma população a médio e longo prazos. Em espécies ameaçadas, as populações apresentam-se reduzidas e muitas vezes isoladas, o que pode levar a uma consequente perda de variabilidade pela redução do fluxo gênico. Desta forma, torna-se importante buscar a manutenção de altos níveis de diversidade genética das populações.

Pesquisador responsável: Dra. Ana Paula Cazerta Farro.

META 3 – Monitoramento das histopatologias/ alterações ósseas e análises bacteriológicas/ fúngicas nos cetáceos

Monitorar e avaliar a saúde dos cetáceos após o impacto através da análise histopatológica/microbiológica e da *causa mortis*, dando suporte para a compreensão dos impactos gerados nos cetáceos e na qualidade do ambiente. A saúde dos cetáceos pode refletir a qualidade de seu habitat, por isso, o monitoramento e avaliação dos achados histopatológicos/bactérias e fungos darão suporte para a compreensão de possíveis impactos gerados no ambiente, inclusive para outras metas do monitoramento. As alterações patológicas/microbiológicas podem indicar se os espécimes estão sendo acometidos por alterações ambientais prejudiciais, bem como indicar parâmetros que podem alterar a saúde de seus órgãos e sistemas. O monitoramento das alterações/patologias ósseas também pode indicar a longo prazo características populacionais específicas adquiridas por mudanças ambientais, genéticas ou pressões antrópicas. Priorização das análises para espécies de odontocetos mais frequentes e ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*).

Pesquisador responsável: Dr. Leonardo Serafim da Silveira.

META 4 - Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

Monitorar as concentrações de contaminantes nos tecidos nas espécies de cetáceos mais frequentes encontradas mortas encalhadas nas praias do Espírito Santo, priorizando as espécies ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*), e incluindo amostras disponíveis coletadas antes

do rompimento da barragem, visando avaliar o estado de saúde destes animais.

Pesquisador responsável: Dr. José Lailson Brito Jr.

META 5 - Estimativa da idade e maturação dos cetáceos

Monitorar a classe etária e reprodutiva dos animais encontrados mortos através da estimativa da idade e da maturação nas espécies de cetáceos mais frequentes encontradas mortas encalhadas nas praias do Espírito Santo, priorizando as espécies ameaçadas (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*). Adicionalmente, fornecer informações para subsidiar as o monitoramento dos contaminantes.

Pesquisadores responsáveis: Dr. Alexandre de Freitas Azevedo, Dra. Haydée Andrade Cunha.

META 6 - Ecologia trófica a partir de isótopos estáveis

Caracterizar a ecologia trófica de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* a partir da análise de isótopos estáveis de carbono e de nitrogênio.

Pesquisador responsável: Dra. Tatiana Lemos Bisi.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
META 1 – Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo - Número de ocorrência de cetáceos encalhados; - Número de atendimentos (até 50 por ano) com registros de dados: localidade, data e biometria dos animais; - Número de necropsias realizadas; - Número de diagnósticos de óbitos; - Número de cetáceos removidos (até 50 por ano) e destinação; - Tipo de amostra biológica colhida e tipo de análise laboratorial Laudo de necropsia (até 50 por ano).	Instituto Baleia Jubarte/IBJ (norte do Rio Doce). Instituto ORCA (sul do Rio Doce)
META 2 – Diversidade genética de cetáceos - Número de tecidos (amostras, até 50 espécimes por ano) que tiveram o DNA extraído e qual a concentração quantificada para cada amostra; - Número de amostras amplificadas com sucesso para cada marcador testado; - Tamanho do fragmento amplificado e após edição; - Número de locos amplificados; - Índices de diversidade genética para cada marcador; - Índice de estruturação genética (espacial e temporal).	Dra. Ana Paula Cazerta Farro
META 3 – Monitoramento das histopatologias, análises bacteriológicas e fúngicas em cetáceos Lista dos patógenos (bactérias e fungos) encontrados nos cetáceos (até 50 espécimes); Achados histopatológicos que acometeram os cetáceos (até 50 espécimes); Alterações osteológicas encontradas nos cetáceos.	Dr. Leonardo Serafim da Silveira
META 4 – Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos - Concentrações de mercúrio total (HgT) em tecidos de cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano; - Concentrações de elementos-traço (As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn) em tecidos de	Dr. José Lailson Brito Jr.

cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano; - Concentrações de organobromados em tecidos de 35 cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano; - Concentrações de organoclorados em tecidos de 35 cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano; - Concentrações de HPAs em tecidos de cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano;	
META 5 – Estimativa da idade e maturação dos cetáceos - Estimativa da idade de cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano; - Classificação da maturidade de cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano.	Dr. Alexandre de Freitas Azevedo
META 6 – Ecologia trófica a partir de isótopos estáveis - Determinar a razão isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em músculo de cetáceos, até um n amostral máximo de 35 indivíduos por ano.	Dr. Tatiana Lemos Bisi

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
META 1 – Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo - Avaliação de quais as espécies que mais encalharam, análise da faixa etária dos animais (filhote, jovem ou adulto), qual a localidade que deteve o maior número de ocorrências e qual o provável motivo para a maioria das mortes.	Instituto Baleia Jubarte /IBJ (norte do Rio Doce) Instituto ORCA (sul do rio doce)
META 2 – Diversidade genética de cetáceos - Análise espaço-temporal da diversidade genética dos odontocetos na região, demonstrando uma tendência de manutenção, aumento ou diminuição dos índices, incluindo dados pretéritos ao rompimento da barragem; - Análise de estruturação, demonstrando a presença de uma ou mais populações das espécies de botos-cinzas no litoral do ES.	Dra. Ana Paula Cazerta Farro
META 3 – Monitoramento das histopatologias, análises bacteriológicas e fúngicas em cetáceos - Identificação das histopatologias/alterações osteológicas e detecção dos patógenos (bactérias e fungos) encontrados nos cetáceos, relacionar a possível causa mortis dos animais e/ou influências na higidez; - Discussão sobre quais fatores poderiam estar interferindo/impactando a saúde dos animais e favorecendo a prevalência de cada patógeno.	Dr. Leonardo Serafim da Silveira
META 4 – Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos - Relacionar as concentrações de contaminantes (elementos-traço e contaminantes orgânicos) determinadas nos tecidos dos cetáceos, priorizando as espécies ameaçadas e mais frequentes na área de estudo (<i>Sotalia guianensis</i> e <i>Pontoporia blainvillei</i>) com parâmetros biológicos (idade, comprimento total, sexo); - Comparar as concentrações de contaminantes encontradas nos animais da costa do ES com a literatura disponível; - Comparar as concentrações de contaminantes de diferentes regiões ao longo da costa do Espírito Santo e períodos de coleta (análise temporal das concentrações, incluindo análise em cetáceos coletados antes do rompimento da barragem).	Dr. José Lailson Brito Jr.
META 5 – Estimativa da idade e maturação dos cetáceos - Descrever a distribuição etária dos cetáceos coletados; - Descrever o grau de maturidade sexual dos cetáceos coletados com gônadas em condição que permita a análise; - Disponibilização dos dados para as análises de contaminantes; - Comparação dos dados com a literatura disponível.	Dr. Alexandre de Freitas Azevedo
META 6 – Ecologia trófica a partir de isótopos estáveis - Caracterização da ecologia trófica de <i>Sotalia guianensis</i> e <i>Pontoporia blainvillei</i>; - Comparação da ecologia trófica de <i>Sotalia guianensis</i> e <i>Pontoporia blainvillei</i> entre sexo, estágio de maturidade sexual e entre espécies. - Comparação dos dados com a literatura disponível.	Dr. Tatiana Lemos Bisi

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

Para a meta 1, de “Atendimento aos encalhes de cetáceos”, a malha amostral será todo o litoral do Espírito. Essa será executada por duas equipes, uma atendendo ao norte do rio Doce e a outra ao sul do rio Doce. A frequência amostral será oportunística, ou seja, em função dos eventos de encalhes. Todos os encalhes de cetáceos serão registrados. Quando encalhados vivos as duas equipes auxiliarão a empresa que realiza o PMP no momento do encalhe. Já os animais mortos serão recebidos após o recolhimento e entrega pela empresa que realiza o PMP para assim serem necropsiados, quando possível, a depender do estágio de decomposição das carcaças recebidas.

As metas 2 a 6, que envolvem análises laboratoriais, seguirão a mesma malha (litoral do Espírito Santo) e frequência amostral da meta 1, no entanto, para essas serão priorizadas as espécies de odontocetos mais frequentes e ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*).

6.2. META 1 – Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo

- Atendimento a Encalhes de Cetáceos Vivo

Será prestada assistência ao PMP/BC-ES, para encalhes de cetáceos com vida, relativo a cuidados de saúde e demais suportes e procedimentos necessários objetivando a amenizar o sofrimento do animal. Dessa forma, o atendimento será feito no local do encalhe e, caso as condições do animal permitam, será feita a tentativa de devolução imediata do animal para o mar. Em casos de encalhes das grandes baleias vivas, o porte do animal não permite a remoção dos mesmos para reabilitação. De acordo com as possibilidades serão colhidas amostras biológicas para análises laboratoriais.

Todos os procedimentos de manejo para o resgate, atendimento e registros de dados de cetáceos vivos encalhados seguirão basicamente as recomendações do Protocolo da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE) (IBAMA, 2005) e do guia *Marine Mammals Ashore* (GERACI & LOUNSBURY, 2005).

- Atendimento a encalhe de pequenos cetáceos em laboratório

As carcaças de odontocetos menores que 3 metros de comprimento, consideradas pequenas, serão resgatadas pelo PMP/BC-ES. Os cetáceos que encalharem no litoral norte do ES serão levadas ao laboratório do Instituto Baleia Jubarte, e os cetáceos que encalharem no litoral Sul do ES serão levados para o Instituto ORCA. Os animais serão submetidos a biometria, foto-documentação, necropsia, colheita de amostras biológicas para análises, e registro em fichas padronizadas com o número de tombamento das respectivas instituições. As técnicas de todos os exames e colheita de amostras seguirão o padrão do guia *Marine Mammals Ashore* (GERACI & LOUNSBURY, 2005) e Protocolo da REMANE (IBAMA, 2005).

- Atendimento a Encalhes de Grandes Cetáceos Mortos

Todas as espécies de cetáceos encontrados mortos ao longo das praias da área alvo serão

identificados, georreferenciados, registrados, e sempre que possível será realizado necropsia no local, coleta de dados morfométricos e material biológicos para análises laboratoriais. As técnicas de todos os exames e colheita de amostras seguirão o padrão do guia *Marine Mammals Ashore* (GERACI & LOUNSBURY, 2005) e Protocolo da REMANE (IBAMA, 2005).

6.3. META 2 – Diversidade genética de cetáceos

Serão utilizadas amostras de músculo ou pele dos cetáceos encontrados encalhados nas praias do Espírito Santo, priorizando as espécies ameaçadas de extinção (*Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*). Amostras de cetáceos coletados antes do rompimento da barragem poderão ser utilizadas para fins de comparações entre o Pré-rompimento e o Pós-rompimento. As amostras serão armazenadas em microtubos e conservados em álcool 70%. Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Laboratório de Genética e Conservação Cetáceos (LAGEC), no prédio BIOAQUA, localizado no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em São Mateus.

O DNA das amostras será extraído, quantificado em espectrofotômetro e amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a utilização de marcadores moleculares do DNA mitocondrial, DNA nuclear e/ou marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os produtos do PCR serão sequenciados e/ou genotipados. A sexagem molecular via PCR também será realizada.

Em relação às análises do DNA mitocondrial, as sequências serão alinhadas com o programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013). Os índices de diversidade e estruturação genéticos serão acessados com os programas Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010), DNAsp (Rozas et al., 2010) e Network (Bandelt et al. 1999). Quanto às análises do DNA nuclear, os genótipos serão avaliados no programa GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems) e os índices de diversidade e estruturação genética serão avaliados com os programas Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010), Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996) e Structure v.2.3.2 (Pritchard et al. 2000). Caso sejam utilizados SNPs, será construída uma biblioteca de SNPs e em seguida as leituras dos *reads* serão realizadas. A qualidade, filtragem e montagem dos catálogos de SNPs serão aferidos com os programas FastQC (Andrews, 2018), MultiQC (Ewels et al 2016), Trimmomatic v.0.32 (Bolger et al 2014) e STACKS (Catchen et al 2011). O rastreamento dos SNPs e a aplicação dos filtros serão realizados com os programas Bowtie2 (v2.2.4) e *Populations* do STACKS, respectivamente.

6.4. META 3 – Histopatologia/alterações ósseas e microbiologia (bactérias e fungos)

Amostras de tecidos colhidas durante a realização das necropsias dos cetáceos (que apresentem COD 1, 2 ou 3) serão fixadas em formalina neutra tamponada a 10% e enviadas para o Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF (LMPA). No LMPA serão clivadas em fragmentos menores e acondicionadas em histossetes plásticos para o processamento histológico no processador automático, onde serão desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina

contendo as amostras de tecidos serão cortados no micrótomo em seções de 5 µm de espessura. Os cortes serão coletados em lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise no microscópio óptico. As alterações ósseas serão identificadas com base na avaliação morfológica dos ossos após o processo de maceração, considerando a comparação com o padrão anatômico normal, conforme registros da literatura para as espécies e serão avaliadas nos locais de tombamento da coleção, preferencialmente no CEUNES/UFES São Mateus-ES.

Para as análises microbiológicas (bactérias e fungos), as amostras serão coletadas com swab com meio Stuart durante as necropsias, deverão ser acondicionadas em temperatura ambiente ou geladeira e enviadas para o Laboratório de Sanidade Animal (LSA) da UENF, onde serão semeadas e processadas em meios de cultura (caldos e/ou em agares) para o crescimento de microrganismos patogênicos. Posteriormente, as amostras serão incubadas em estufas e aquelas que apresentarem crescimento bacteriano/fúngico serão repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. Após esses processos, serão realizadas as identificações microbianas por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. Com os microrganismos identificados, serão realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas.

6.5. META 4 – Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

As análises de contaminantes serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), alíquotas de músculo, fígado e rim das amostras frescas serão digeridas a frio. As determinações serão realizadas usando um Espectrômetro de Absorção Atômica com gerador de vapor frio (Malm et al. 1989; Bastos et al. 1998). A certificação do método de determinação do HgT será feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de *Dogfish*) e DORM-2 (músculo de *Dogfish*) do *National Research Council* do Canadá.

Para a determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cd, Cu, Fe, Mn e Zn), alíquotas de de músculo, fígado e rim serão digeridas com ácido nítrico (Dorneles et al., 2007; Lailson-Brito et al., 2012). A determinação das concentrações dos elementos será realizada utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS). O controle de qualidade será efetuado através do uso de materiais certificados de referência do *USA National Institute of Standards and Technology* e/ou do *National Research Council* do Canadá.

Para a determinação de compostos organoclorados, a metodologia será adaptada da literatura. (LAILSON-BRITO et al., 2012; SANTOS-NETO et al., 2014). Os pesticidas e as bifenilas policloradas (PCBs) serão mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massas (MS) que irá operar em modo de impacto de elétrons (EI). Será aceita uma variação de $\pm 30\%$ na recuperação do padrão interno. Ao todo serão analisados 7 pesticidas e 27 congêneres de PCB. As concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios, será quantificado por gravimetria. A certificação dos compostos será realizada por meio da análise do material de referência

de tecido adiposo de baleia-piloto (*Standard Reference Material 1945, National Institute of Standards and Technology*) e a recuperação dos compostos será aceita de acordo com os critérios estabelecidos por Wade & Cantillo (1994).

Para a determinação de compostos organobromados de origem antrópica e natural será realizada uma adaptação de métodos já descritos anteriormente (DORNELES et al., 2010; ALONSO et al., 2012). Os PBDEs e MeO-PBDEs serão mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massa (MS). O GC-MS irá operar no modo de ionização química negativa (ECNI), com a amônia utilizada como gás reagente. Será aceita uma variação de $\pm 30\%$ na recuperação do padrão interno. Os compostos organobromados de origem antrópica analisados consistirão em 7 congêneres de PBDEs, PBEB e HBBZ, além de 8 congêneres de MeO-BDE de origem natural. As concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios, também medido por gravimetria. A certificação dos compostos será realizada por meio da análise do material de referência de tecido adiposo de baleia-piloto (*Standard Reference Material 1945, National Institute of Standards and Technology*) e a recuperação dos compostos será aceita de acordo com os critérios estabelecidos por Wade & Cantillo (1994).

A metodologia de análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) será adaptada e otimizada a partir de procedimentos descritos pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, *Environmental Protection Agency*), Yoshimine e Carreira (2012) e por Barros (2014). Todas as análises serão realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), o qual irá operar no modo de Impacto de Elétrons (EI). Será aceita a recuperação de 40 a 110% do padrão interno (WEIJS et al., 2016). Ao todo, serão analisados 6 HPAs de origem petrogênica e 12 HPAs de origem pirolítica. A certificação dos compostos será realizada por meio da análise do material de referência de tecido de mexilhão (*Standard Reference Material 2977, National Institute of Standards and Technology*).

6.6. META 5 – Estimativa da idade e maturação dos cetáceos

As análises de determinação da idade e da maturação serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ.

A idade dos odontocetos será estimada a partir da contagem dos grupos de camadas de crescimento (GLGs, *Growth Layer Groups*), depositados na dentina e/ou cimento do dente desses animais (Perrin & Myrick, 1980). A determinação da idade será realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinedo & Hohn (2000). As leituras serão realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises de maturidade, as gônadas serão coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, serão fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Fragmentos da região central do testículo contendo 1 cm³ serão emblocados em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). As leituras serão realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A

maturidade será avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides nos túbulos seminíferos, além da avaliação diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial (Hohn et al., 1985). Os ovários serão inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. A determinação da maturidade sexual será baseada em Perrin e Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans serão consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpora lúteos ou albicans em um ovário serão consideradas maduras.

6.7. META 6 – Ecologia trófica a partir de isótopos estáveis

Essas análises serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

A determinação das razões isotópicas de carbono e de nitrogênio será realizada em tecido muscular dos cetáceos. A mensuração será feita em espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS-Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific) acoplado ao analisador elementar C-N-S (Flash 2000). As razões isotópicas serão expressas pela notação delta (δ) em partes por mil, segundo a equação $\delta X = [(Ramostra/Rpadrão) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N , e R representa a razão $^{13}C/^{12}C$ ou $^{15}N/^{14}N$. Para o carbono o padrão utilizado é o fóssil Belemnita da formação PeeDee - PDB e para o nitrogênio o N_2 atmosférico. O controle de qualidade analítico será feito por meio do uso de materiais certificados de referência e brancos analíticos em todas as análises. Será calculada a relação C:N para verificar o conteúdo lipídico de cada amostra e quando o valor foi maior que 3,5, será feita a normalização matemática dos resultados de $\delta^{13}C$, segundo a equação: $\delta^{13}C_{normalizado} = \delta^{13}C_{sem\ tratamento} - 3,32 + 0,99 \times C:N$ (Post et al., 2007).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M. B.; ELJARRAT, E.; GORGA, M.; SECCHI, E. R.; BASSOI, M.; BARBOSA, L.; BERTOZZI, C. P.; MARIGO, J.; CREMER, M.; DOMIT, C.; AZEVEDO, A. F.; DORNELES, P.R.; TORRES, J.P.M.; LAILSON-BRITO, J.; MALM, O.; BARCELÓ, D. Natural and anthropogenically-produced brominated compounds in endemic dolphins from Western South Atlantic: Another risk to a vulnerable species. *Environmental Pollution*, v. 170, p. 152–160, 1 nov. 2012.
- AZEVEDO-SILVA, C. E.; AZEREDO, A.; DIAS, A.; COSTA, P.; LAILSON, B. J.; MALM, O.; GUIMARÃES, J. R.; MACHADO, T. J. P. Organochlorine compounds in sharks from the Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, n. 2, p. 294–298, 1 fev. 2009.
- BANDELT, H. J, FOSTER, P.; ROHL, A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48, 1999.

BARROS, I. P. Caracterização da contaminação do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) da baía de Guanabara por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2014. 92f. Monografia (Bacharelado em Oceanografia) - Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.

BASTOS, W. R.; MALM, O.; PFEIFFER, W. C; CLEARY, D. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brasil. *Ciência e Cultura*, v. 50, n. 4, p. 255-260, 1998.

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

BISI, T. L., LEPOINT, G., AZEVEDO, A. F., DORNELES, P. R., FLACH, L., DAS, K., MALM, O., LAILSON-BRITO, J. Trophic relationships and Mercury biomagnification in Brazilian tropical coastal food webs. *Ecological Indicators*, v. 18, pp. 291-302, 2012

BISI, T. L.; DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; LEPOINT, G.; AZEVEDO, A. F.; FLACH, L.; MALM, O.; DAS, K. Trophic relationships and habitat preferences of delphinids from the Southeastern Brazilian coast determined by carbon and nitrogen stable isotope composition. *Plos One*, v. 8, p. e82205, 2013.

BISI, T. L.; LAILSON-BRITO, J.; MALM, O. Ecologia Alimentar em Mamíferos Marinhos: Técnicas de Estudo. *Oecologia Australis*, v. 16, p. 210-234, 2012b.

DE OLIVEIRA-FERREIRA, NARA.; MANHÃES, BÁRBARA M.R.; SANTOS-NETO, ELITIERI, B.; ROCHA, YASMIN; GUARI, EMI B.; BOTTA, SILVINA; COLOSIO, ADRIANA C.; RAMOS, HERNANI G.C.; BARBOSA, LUPÉRCIO; CUNHA, IAN A.G.; BISI, TATIANA L.; AZEVEDO, ALEXANDRE F.; CUNHA, HAYDÉE A.; LAILSON-BRITO, JOSÉ. Franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, as environmental sentinels of the world's largest mining disaster: Temporal trends for organohalogen compounds and their consequences for an endangered population. *Environmental Pollution*, v. 306, p. 119370, 2022.

DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; RESENDE, E.; SECCHI M.; BASSOI, C.; PEREIRA, C. L. MACHADO, J. P.T.; OLAF.; M. Cadmium concentration in Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from South Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 55, n. 3, p. 179–186, 2007.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis', *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50. 2010.

GERACI, J. R.; LOUNSBURY, V. J. Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings. 2 ed. Baltimore, MD: National Aquarium in Baltimore, 371 pp. 2005.

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

IBAMA. Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos da Rede de Encalhe de Mamíferos Aquáticos do Nordeste – REMANE/IBAMA., 296 pp. 2005.

LAILSON-BRITO, J. et al. Mercury-Selenium relationships in liver of Guiana Dolphin: The possible role of Kupffer cells in the detoxification process by Tiemannite formation. PLoS ONE, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.

MALM, O. Utilização do acessório de vapor frio para investigação de mercúrio em amostras ambientais por espectrofotometria de absorção atômica. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 41, p. 88-92, 1989.

MANHÃES, B. M. R.; VANNUCI-SILVA, M.; BRIÃO, J. A.; GUARI, E. B.; BOTTA, S.; COLOSIO, A. C.; RAMOS, H. G. C.; BARBOSA, L. A.; CUNHA, I. A. G.; AZEVEDO, A. F.; CUNHA, H. A.; BISI, T. L.; LAILSON-BRITO, J. Temporal trends of trace elements bioaccumulation by a vulnerable cetacean (*Pontoporia blainvillei*) before and after one of the largest mining disasters worldwide. Science of the Total Environment, v. 804, p. 150196, 2022.

MICHENER, R. H., KAUFMAN, L. “Stable isotope ratios as tracers in marine food webs: an update”. In: Michener, R.H., Lajtha, K. (eds), Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science, pp. 238–282, Oxford, UK, Wiley-Blackwell. 2007.

PERRIN, W. F.; G. P. DONOVAN. Habitat use patterns of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off southern Brazil in relation to water depth. 1984.

PERRIN, W.; MYRICK, A. C. Age determination of toothed whales and sirenians. Cambridge ([Red House Station Rd. Histon Cambridge CB4 4NP]): International Whaling Commission, 1980.

PINEDO, M. C.; HOHN, A. A. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for a precision in the age estimation. Marine Mammal Science, v. 16, n. 1, p. 1-27, 2000.

POST, D.M. et al. 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. Oecologia 152:179-189.

ROZAS, J., LIBRADO, J.C, SÁNCHEZ-DELBARRIO, X.; ROZAS, R. DnaSP version 5.10.1 (Self-extracting file of 4.6 Mb). Universitat de Barcelona. 2010.

SANTOS-NETO, E. B. et al. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. Science of The Total Environment, v. 472, p. 194–203, 15 fev. 2014.

AVES MARINHAS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Leandro Bugoni	Coordenador	FURG
Guilherme Tavares Nunes	Pesquisador responsável pela análise integrada de dados dentro e fora do projeto	UFRGS
Márcio Amorim Efe	Pesquisador responsável pela coleta de dados e amostras	UFAL
Júlia Jacoby (bolsista mestranda)	Pesquisador responsável por análises de rastreamento remoto	UFRGS
Bruno Linhares (MEI)	Pesquisador responsável por análises de dados de isótopos e Sternidade costeiros	FURG
Pós-doutorando (a contratar)	Pesquisador responsável por análises de contaminantes	FURG
Pós-doutorando (a contratar)	Pesquisador responsável por gestão de dados e amostras	FURG
Pós-doutorando (Aline Fregonezzi)	Pesquisador responsável por análises genéticas	FURG
Pós-doutorando (Márcio Repenning)	Pesquisador responsável pela gestão de dados e amostras	FURG
Tatiana Neves	Coordenadora amostragens no mar, praia e saúde	Projeto Albatroz
Caio Marques	Pesquisador contagens de aves no mar	Projeto Albatroz
Pós-doutorando (Gustavo Leal)	Pesquisador responsável pelas contagens de aves no mar e praias	FURG/Projeto Albatroz
Pós-doutorando (Igor Acosta)	Pesquisador responsável pelas análises de saúde	FURG/Projeto Albatroz
Leonardo Marques Furlanetto	Apoio Técnico para processamento de amostras biológicas	FURG
Cynthia Campolina de Melo Vianna	Apoio Técnico para coleta de dados e amostras	FURG
Victor da Silva Libardi (MEI)	Apoio Técnico para coleta de dados e amostras	FURG
Bolsista Iniciação Científica	Análises de rastreamento remoto	UFRGS
Bolsista Iniciação Científica	Análises de isótopos estáveis	FURG

2. ESCOPO

Aves marinhas, por serem predadores de topo da cadeia trófica, são amplamente utilizadas como biomonitores e bioindicadores da qualidade do ambiente marinho (Diamond & Devlin, 2003; Parsons et al., 2008), pois refletem processos que ocorrem ao longo da teia trófica, tanto em relação a alterações ecossistêmicas quanto a contaminação por poluentes (Durant et al., 2009; Phillips & Waluda, 2020). Adicionalmente, o fato de alimentarem-se no mar e nidificarem em terra, proporciona uma oportunidade ideal para os pesquisadores acessarem esses animais para coletar informações sobre o ecossistema marinho (Signa et al., 2021; Strøm et al., 2021), bem como condições de saúde e parâmetros demográficos (Carneiro et al., 2020; Charbonnel et al., 2022). Portanto, a coleta de dados sobre as aves marinhas é fundamental para uma avaliação robusta do potencial impacto ecossistêmico do

rompimento da barragem de Fundão sobre o ambiente marinho, especialmente em relação a espécies ameaçadas de extinção. A presente proposta está baseada em dois princípios básicos: (1) análise integrada de uso do espaço e dos recursos alimentares e suas consequências para a contaminação biológica, saúde, demografia e reprodução, e diversidade genética de aves marinhas que utilizam a área impactada pelos rejeitos da barragem; e (2) comparações para todos os parâmetros entre os períodos pré e pós rompimento da barragem de Fundão. O monitoramento realizado nos primeiros 3 anos (2018 a 2021) permitiu compreender que o lançamento de rejeitos na área de alimentação das aves marinhas não causou substancial indisponibilidade de presas, de modo que as espécies indicadoras seguem utilizando as mesmas áreas e os mesmos recursos do período pré rompimento (Nunes et al., 2022). Similarmente, as contagens de aves no mar e nas praias indicam que as áreas mais utilizadas estão na foz do Rio Doce e em suas adjacências imediatas (Nunes et al., 2022). No entanto, os tecidos biológicos amostrados das aves encontram-se contaminados com os elementos não essenciais contidos nos rejeitos e os indivíduos analisados têm apresentado problemas sanitários, demonstrando que as aves estão expostas a uma contaminação crônica em suas áreas de alimentação (Nunes et al., 2022). Cabe ressaltar que tais áreas passam por sucessivos eventos de recontaminação, devido à descarga do Rio Doce em períodos chuvosos e à ressuspensão de rejeitos depositados no fundo sobre a plataforma continental, em situação de aumento nas ondulações. O cenário observado ilustra um processo de armadilha ecológica (Nunes et al., 2022), no qual os organismos utilizam ambientes e recursos com potencial de gerar efeitos deletérios em nível populacional em médio prazo, especialmente em espécies ameaçadas de extinção, como *Sterna hirundinacea* e *Phaethon aethereus*, ou que possuem relação de total dependência com áreas e recursos impactados, como *Sula leucogaster*. Nesse contexto, faz-se necessária a continuidade do monitoramento em médio prazo para acompanhar o uso da área e dos recursos alimentares e seus efeitos em níveis individual e populacional, utilizando espécies indicadoras da saúde do ambiente, mas também avaliando o uso da região em nível de comunidade. Destaca-se que esses efeitos da contaminação sobre a megafauna não são imediatamente detectados, especialmente por conta de suas estratégias de sobrevivência, como grandes intervalos reprodutivos, baixa fecundidade, ocupação de extensas áreas no oceano, alta mobilidade, elevada longevidade, dentre outros. Além disso, mudanças nos tamanhos das populações são resultado de processos demográficos e evolutivos lentos, os quais ocorrem durante longos períodos de tempo, especialmente em animais de vida longa como as aves marinhas (Weimerskirch, 2018). Portanto, algumas variáveis demográficas e de distribuição temporal e espacial necessitam de estudos de longa duração, detalhados e padronizados, para subsidiar conclusões robustas (Becker, 2003; Clutton-Brock & Sheldon, 2010; Lavoie et al., 2014; Margalida, 2017).

3. OBJETIVO

Monitorar parâmetros biológicos de aves marinhas que utilizam a foz do Rio Doce e adjacências para alimentação e reprodução.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Monitorar a distribuição espacial e o uso das áreas impactadas

Avaliar e monitorar a distribuição, abundância e área de vida das aves marinhas em áreas impactadas adjacentes à foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas próximas, incluindo unidades de conservação da região.

Justificativa – A análise dos dados de rastreamento associados a dados oceanográficos gera informações importantes sobre o uso da área afetada pelas aves ao longo dos vários meses do ano e entre anos com influências de oscilações oceanográficas como *El Niño* e *La Niña*. Em nível populacional os dados de rastreamento proverão informações sobre o deslocamento e forrageamento das aves pela área afetada. Além disso, em nível individual, os dados de rastreamento cruzados com dados de contaminantes e sucesso reprodutivo podem permitir a avaliação a médio-longo prazo de possíveis alterações, as quais podem estar relacionadas aos impactos provenientes do desastre. Contagens no mar nas áreas costeiras (praia, manguezais, estuários) fornecem dados acerca da composição específica e abundância das espécies, identificando mudanças rápidas quanto ao uso de áreas, além de indicarem locais adequados para descanso e alimentação das populações de aves marinhas, costeiras e aquáticas continentais.

A fixação de equipamentos de rastreamento remoto em aves marinhas que utilizavam a área atingida pelos rejeitos da barragem de Fundão previamente ao rompimento, permite testar variações nas estratégias de uso do espaço entre os períodos pré e pós rompimento. Técnicas analíticas de segmentação das trajetórias fornecem informações acuradas sobre as áreas de alimentação no mar, o que permite identificar espacialmente a origem da contaminação. Adicionalmente, comparações de estratégias de uso do espaço entre os anos de monitoramento pós rompimento permitem testar a persistência de utilização das áreas contaminadas, o que serve como base para explicar a contaminação. Em suma, é fundamental conhecer as áreas de alimentação e suas variações no tempo para explicar potenciais alterações nos níveis de contaminantes nos tecidos biológicos amostrados. Em nível populacional, os dados de rastreamento remoto fornecem informações sobre o deslocamento e forrageamento das aves, viabilizando monitorar o uso das áreas de alimentação previamente utilizadas, bem como o efeito do uso dessas áreas sobre os níveis de contaminação nos tecidos biológicos amostrados. Em nível individual, os dados de rastreamento, associados a dados de contaminantes e sucesso reprodutivo podem permitir a avaliação em médio-longo prazos de possíveis alterações, as quais podem estar relacionadas aos impactos provenientes do rompimento da barragem. Contagens no mar e nas praias da foz do Rio Doce e adjacências fornecem dados acerca da composição específica e abundância das espécies, identificando mudanças quanto ao uso de áreas, além de indicarem locais adequados para descanso e alimentação das populações de aves marinhas, costeiras e aquáticas continentais. As contagens ainda permitem avaliar potenciais alterações na composição das assembleias de aves que utilizam a região como área de descanso e/ou alimentação.

META 2 – Monitorar a utilização de recursos alimentares

Determinar variações na ecologia trófica de aves marinhas que se alimentam na foz do Rio Doce e adjacências, como via de contaminação.

Justificativa – A principal via de contaminação para as aves marinhas que utilizam a foz do Rio Doce e adjacências como área de alimentação é através da ingestão de presas contaminadas. Portanto, o monitoramento das presas ingeridas pelas aves marinhas é crucial para identificar potenciais alterações na dieta entre os períodos pré e pós rompimento, bem como entre os anos monitorados no período pós rompimento. Potenciais alterações na dieta ao longo dos anos amostrados podem indicar alteração na disponibilidade das presas preferenciais e, portanto, isso demonstra ainda o potencial das aves marinhas como fonte de informação sobre a estabilidade da comunidade epipelágica. Adicionalmente, análises de dieta através de métodos complementares, como a análise de material regurgitado e análise de isótopos estáveis, associadas com análises de rastreamento remoto e análise de contaminação, permitem estimar e explicar potenciais consequências em nível populacional em médio e longo prazo, como falhas reprodutivas e flutuações no tamanho populacional. Nesse contexto, faz-se necessário o monitoramento de espécies que utilizam a região costeira impactada para alimentação, como *Phaethon aethereus*, *Sula leucogaster*, e espécies de Sternidae costeiros.

META 3 – Monitorar a contaminação de aves marinhas

Monitorar a variação nas concentrações de metais/elementos-traço em aves marinhas que utilizam a foz do Rio Doce e adjacências para alimentação (*Phaethon aethereus*, *Sula leucogaster*, e Sternidae costeiros).

Justificativa – A determinação dos níveis de contaminação nas aves é uma informação essencial para a determinação da contaminação oriunda do rompimento da barragem de Fundão e de outras fontes, além de permitir detectar efeitos letais e subletais, tais como alterações na saúde e sucesso reprodutivo das aves. Em nível populacional, a correlação dos dados de rastreamento e contaminantes proverão informações sobre a origem espacial da contaminação. Devido à sua alta mobilidade e potencial como “espécies-sentinela”, a análise de contaminação em tecidos biológicos de aves marinhas também fornece informações sobre a contaminação ambiental, preenchendo lacunas espaciais e temporais deixadas pelos demais temas do PMBA. Adicionalmente, a análise de contaminantes nos tecidos das presas utilizadas pelas aves marinhas permite identificar com precisão a origem da contaminação observada nos tecidos das aves, enquanto a análise de contaminantes nas cascas de ovos das aves marinhas permite estimar o *input* de contaminantes no ambiente terrestre insular das áreas reprodutivas, bem como explicar potenciais falhas reprodutivas.

META 4 – Monitorar a demografia e a reprodução de aves marinhas

Monitorar o tamanho populacional e o sucesso reprodutivo das espécies indicadoras que se reproduzem em Abrolhos (*Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster*) e nas ilhas costeiras do Espírito Santo (*Sterna hirundinacea*), as quais utilizam a foz do Rio Doce e adjacências para alimentação.

Justificativa - A análise dos dados sobre o tamanho populacional e parâmetros reprodutivos gera informações importantes para avaliar a dinâmica populacional das aves que usam a área afetada, possibilitando verificar em médio-longo prazos possíveis alterações e risco de extinção local ou nacional, as quais podem estar relacionadas aos impactos provenientes do rompimento da barragem de Fundão. Desse modo, o monitoramento de espécies indicadoras nas áreas reprodutivas permite avaliar potenciais consequências originadas pela ingestão de contaminantes nas áreas de alimentação, bem como prever efeitos negativos sobre a reprodução e em nível populacional, orientar ações práticas de remediação e compensação e avaliar o risco de extinção regional das populações reprodutivas.

META 5 – Monitorar a diversidade genética

Monitorar a diversidade genética e parâmetros genético-populacionais das espécies de aves marinhas que se reproduzem em Abrolhos.

Justificativa – Recentes tecnologias de sequenciamento de nova geração permitiram estudos genômicos de populações naturais de organismos não modelos, especialmente espécies com reduzida variação genética e populações depauperadas (Mesak et al., 2014). Nos últimos anos o sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing – NGS) tem sido aprimorado com intuito de genotipar marcadores SNPs em larga escala, tornando-se um método importante para estudos genéticos populacionais de todo o nível de genoma (Baird et al., 2008). A ingestão de recursos alimentares em áreas contaminadas pode levar a falhas reprodutivas e diminuição do tamanho populacional, o que representa uma potencial perda de diversidade genética em nível populacional, ou efeito de gargalo populacional. As aves *P. aethereus* e *S. leucogaster* que reproduzem em Abrolhos já apresentam baixa diversidade genética em comparação a outras populações da espécie, e até mesmo em relação a populações de outras espécies ameaçadas de extinção. Portanto, processos que levem à diminuição da diversidade genética dessas populações, como o aumento da mortalidade devido a problemas de saúde e à diminuição da natalidade ou recrutamento de juvenis a partir da contaminação, podem gerar efeitos deletérios em nível populacional. A colônia de *P. aethereus* em Abrolhos é a maior em todo o Oceano Atlântico sudoeste, enquanto a colônia de *S. leucogaster* em Abrolhos representa um importante *stepping-stone* entre as colônias costeiras ao sul e as colônias *offshore* ao norte (Nunes e Bugoni, 2018). Desse modo, a perda de diversidade genética, e a potencial extinção dessas populações, também representa perda de potencial evolutivo em nível específico, o que justifica o monitoramento dos índices de diversidade genética dessas populações, visando eventuais medidas práticas de remediação.

META 6 – Monitorar parâmetros sanitários de aves marinhas

Monitorar, a partir de análises moleculares e análises sanitárias a prevalência de patógenos em aves marinhas (*Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster* e Sternidae costeiros) na área de estudo, para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações.

Justificativa – A ingestão de contaminantes pode desencadear consequências negativas para a saúde das aves marinhas como, por exemplo, alterações fisiológicas, capazes de desestabilizar o metabolismo e tornar as aves mais suscetíveis à infecção por microrganismos ou ineficientes no cuidado com a prole. Tais consequências podem levar à disfunção dos padrões reprodutivos a partir de desbalanços hormonais, dificuldade no acúmulo de gordura e energia, orientação no espaço para obtenção de alimento, desidratação, redução da imunidade, dentre outros. Nesse contexto, torna-se importante o monitoramento de parâmetros clínicos, microbiológicos, e hematológicos das espécies indicadoras, o que também contribui para um possível direcionamento de ações práticas de mitigação e remediação do impacto do rompimento da barragem. As aves são susceptíveis a várias doenças, sendo que a suscetibilidade a patógenos pode ser influenciada por condições ambientais que venham a interferir em seu sistema imune e defesas naturais. São, portanto, boas sentinelas da saúde dos ecossistemas (Siciliano et al., 2005). Nas aves de vida livre há sempre forte influência do fator ambiental na saúde das populações, uma vez que as doenças variam de acordo com a qualidade do ambiente utilizado (Chazar et al., 2009; Shivaprasad, 2002). Considerando que estudos prévios já abordaram prevalência de alguns microrganismos considerados de risco infectando aves da região de estudo, notadamente na região de Abrolhos (Gennari et al., 2013; Niemeyer et al., 2013) e também a disponibilidade de amostras de sangue armazenadas destes locais que podem demonstra os parâmetros diagnósticos pré-acidente, ressalta-se a necessidade de avaliar aves de interesse como biomonitores quanto à presença de doenças e patógenos. Isso servirá para compreender o impacto da alteração ambiental nas relações ecológicas e evolutivas das aves marinhas com doenças e microrganismos.

As iniciativas proativas de diagnóstico de enfermidades e exames clínicos e complementares são essenciais para reduzir o efeito de ameaças de doenças à conservação das espécies e entender os padrões epidemiológicos de infecção (Friend e Thomas, 1992). Programas de monitoramento de doenças que envolvam metodologias de vigilância de populações podem elucidar mudanças na sanidade destas, antes da ocorrência de alterações significativas no tamanho ou estrutura das populações (Karesh et al., 1997).

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS (Listar os dados que serão entregues como produto, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Meta 1 – (1) Lista dos indivíduos rastreados com informações sobre conteúdo e localização do ninho; (2) Matrizes de dados espaciais dos indivíduos rastreados; (3) Mapas com áreas de alimentação das aves rastreadas em níveis populacional e individual; (4) Tabela com métricas das trajetórias obtidas com rastreadores remotos em níveis populacional e individual; (5) Testes estatísticos comparativos de estratégias de alimentação entre os períodos de monitoramento; (6) Matrizes e mapas de censos embarcados com localização geográfica das avistagens; (7) Matrizes e mapas de censos realizados nas praias, com localização geográfica das avistagens; (8) Lista de números de tombamento das amostras de aves em coleções de referência ou bancos de amostras.	Prof. Guilherme Tavares Nunes; Prof. Márcio Efe; Prof. Leandro Bugoni.
Meta 2 - (1) Tabela com razões isotópicas de carbono e nitrogênio para cada indivíduo amostrado; (2) Estimativa de nicho isotópico e variações temporais para as espécies amostradas; (3) Tabela com contribuição das presas para a dieta das aves marinhas a partir de dados de isótopos estáveis e material regurgitado; (4) Lista de números de tombamento em coleções de referência ou bancos de amostras.	Prof. Guilherme Tavares Nunes; Prof. Leandro Bugoni.
Meta 3 – (1) Tabela com concentrações dos metais analisados para cada espécie de ave marinha e tecido; (2) Tabela com concentrações de metais para presas das aves e ovos; (3) Lista de números de tombamento em coleções de referência ou bancos de amostras.	Prof. Guilherme Tavares Nunes; Prof. Leandro Bugoni.
Meta 4 - (1) Matrizes com totais de ninhos atuais e pretéritas; (2) Matrizes com conteúdo e estado dos ninhos de <i>Sterna hirundinacea</i> , <i>Phaethon aethereus</i> e <i>Sula leucogaster</i> ao longo dos períodos reprodutivos; (3) Lista de números de tombamento em coleções de referência ou bancos de amostras.	Prof. Márcio Efe.
Meta 5 – (1) Lista de amostras obtidas em campo para cada espécie; (2) Matrizes de sequências moleculares de <i>Sula leucogaster</i> e <i>Phaethon aethereus</i> obtidas antes e após o evento; (3) Tabela comparativa de índices de diversidade genética entre os períodos pré e pós rompimento; (4) Lista de números de tombamento em coleções de referência ou bancos de amostras.	Prof. Guilherme Tavares Nunes.
Meta 6 – (1) Lista de patógenos encontrados em amostras provenientes do monitoramento da região; (2) Avaliação da prevalência de patógenos após o evento; (3) Análise de patógenos encontrados nas aves marinhas e saúde.	Prof. Leandro Bugoni/ Projeto Albatroz

5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 23º mês de vigência do Projeto)	RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)
Meta 1 – Segmentação de trajetórias obtidas com rastreamento remoto para identificação de áreas de alimentação com Modelos Ocultos de Markov em nível individual; Estimativas de densidade de kernel para identificação de áreas de alimentação em nível populacional; Cálculo de sobreposição de áreas de alimentação entre os diferentes períodos amostrados; Cálculo de riqueza e abundância espécie-específica para aves observadas nos censos de praia e mar; Teste de diferença de composição das assembleias de aves entre os diferentes períodos amostras.	Prof. Guilherme Tavares Nunes; Prof. Márcio Efe; Prof. Leandro Bugoni.
Meta 2 – Testes de diferenças univariadas para razões isotópicas de carbono e nitrogênio entre os diferentes períodos amostras; Estimativa de nicho isotópico e suas variações temporais para as aves amostradas; Estimativa de contribuição de presas para a dieta das aves marinhas com modelos mistos para dados isotópicos e índice de importância presa-específica para dados de material regurgitado.	Prof. Guilherme Tavares Nunes; Prof. Leandro Bugoni.
Meta 3 – Testes univariados de variações temporal para cada elemento analisado; estimativa de contribuição presa-específica para a contaminação das aves marinhas.	Prof. Guilherme Tavares Nunes; Prof. Leandro Bugoni.
Meta 4 – Análise da variação interanual no tamanho populacional das espécies indicadoras (<i>Phaethon aethereus</i> e <i>Sula leucogaster</i>); Análise da fenologia reprodutiva das espécies que se reproduzem em Abrolhos; Cálculo de taxas de sucesso reprodutivo das espécies indicadoras.	Prof. Márcio Efe.
Meta 5 – Cálculo dos índices de diversidade genética; Estimativa de diferenciação entre os diferentes períodos amostrados.	Prof. Guilherme Tavares Nunes.
Meta 6 – Teste de variação de parâmetros clínicos e hematológicos entre os diferentes períodos amostrados; Estimativa de prevalência de patógenos. Análise de ocorrência de patógenos. Análise microbiológica e molecular.	Prof. Leandro Bugoni/ Projeto Albatroz

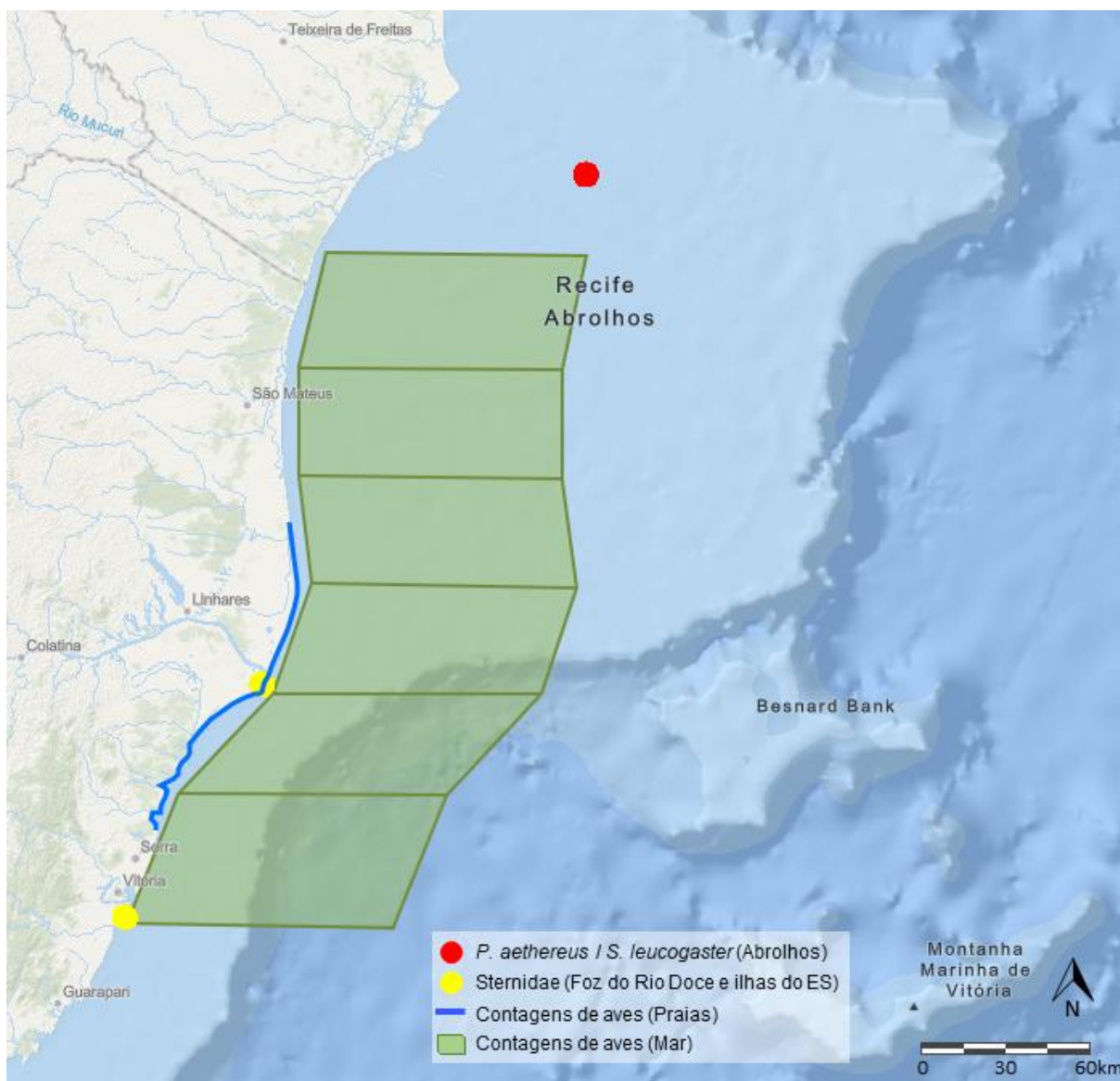
6. METODOLOGIA

6.1. Malha e Frequência Amostral

Tabela 6: Resumo das frequências de amostragem de cada grupo de ave marinha para cada localidade, para atender as seis metas do presente plano de trabalho.

Meta	Espécie/Família/Grupo	Localidade	Frequência de amostragem
1	<i>P. aethereus</i> (rastreamento remoto)	Abrolhos	Semestral
1	<i>S. leucogaster</i> (rastreamento remoto)	Abrolhos	Semestral
1	Aves marinhas (contagens)	Região marinha na foz do Rio Doce e adjacências	Sazonal
1	Aves marinhas (contagens)	Região costeira na foz do Rio Doce e adjacências	Sazonal
2	<i>P. aethereus</i> (sangue, penas, e regurgitado)	Abrolhos	Semestral
2	<i>S. leucogaster</i> (sangue, penas, e regurgitado)	Abrolhos	Semestral
2	Sternidae (sangue, penas, e regurgitado)	Foz do Rio Doce e/ou ilhas do ES	Semestral
3	<i>P. aethereus</i> (sangue, penas, ovos e regurgitado)	Abrolhos	Semestral
3	<i>S. leucogaster</i> (sangue, penas, ovos e regurgitado)	Abrolhos	Semestral
3	Sternidae (sangue, swabs, penas, ovos e regurgitado)	Foz do Rio Doce e/ou ilhas do ES	Semestral
4	<i>P. aethereus</i>	Abrolhos	Quinzenal
4	<i>S. leucogaster</i>	Abrolhos	Quinzenal
4	<i>Sterna hirundinacea</i>	Ilhas do ES	Quinzenal durante o período reprodutivo
5	<i>P. aethereus</i>	Abrolhos	Semestral
5	<i>S. leucogaster</i>	Abrolhos	Semestral
6	<i>P. aethereus</i>	Abrolhos	Semestral
6	<i>S. leucogaster</i>	Abrolhos	Semestral

Figura 16: Mapa com localização dos pontos de coletas de dados e amostras para os diferentes grupos de aves marinhas monitorados.



6.2. Meta 1 - Monitorar a distribuição espacial e o uso das áreas impactadas

Para gerar os mapas das áreas de alimentação de *Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster* serão realizadas expedições para rastreamento remoto das aves com equipamentos miniaturizados multi-sensores no arquipélago dos Abrolhos. Em Abrolhos as aves serão rastreadas durante o período reprodutivo, com equipamentos registradores de posição satelital com frequência de amostragem de 1 posição a cada 10 segundos (modelos igot-U, <<http://www.i-gotu.com/>>) e acelerômetros tri-axiais de aceleração estática e dinâmica com frequência de amostragem de até 100 Hz (Axy-trek <<http://www.technosmart.eu>>). Inicialmente, os ninhos das espécies serão numerados com fitas coloridas como forma de facilitar a localização noturna dos ninhos e organização do desenho amostral. As aves serão capturadas à noite quando estão descansando no ninho, manualmente ou com auxílio

de varas equipadas com rede ou laço, dependendo da necessidade de cada caso. Os equipamentos de GPS (após impermeabilizados com tubos termocontráteis) e acelerômetros (os quais já vêm impermeabilizados de fábrica, com resina tipo epóxi) serão acoplados nas quatro penas centrais da cauda dos adultos utilizando fita especial da marca TESA, modelo 4651 (<http://www.tesatape.com.br/>). Os adultos selecionados terão ninhegos de aproximadamente uma semana de idade, os quais são caracterizados pela ausência de rêmiges e retrizes e corpo coberto apenas por plumas (Nelson 2005). Os equipamentos (mais fita adesiva e anilha) terão cerca de 25 g, o que corresponde a uma medida abaixo dos 3% da massa corporal média das respectivas espécies, o que é considerado seguro e sem efeitos adversos para aves marinhas. Após o processo de fixação do aparelho, que dura aproximadamente 5 minutos, a ave será solta no ninho onde foi capturada. A recaptura para recuperação dos aparelhos será feita na noite seguinte, através do mesmo procedimento referido acima, quando a ave retornar da viagem de alimentação diurna e estiver novamente descansando no ninho. Os instrumentos colocados nas aves podem ser facilmente recuperados e reutilizados, logo após a transferência dos dados para um computador portátil e recarga da bateria. Serão coletados dados de rastreamento, uma vez ao ano para *Sula leucogaster* e duas vezes ao ano para *Phaethon aethereus*, em seus picos reprodutivos. Será considerado como satisfatório um mínimo de duas viagens de alimentação para cada indivíduo. A partir das matrizes de dados com posições geográficas obtidas, serão extraídas informações que descrevem cada viagem, como distância máxima percorrida, distância máxima da colônia, duração da viagem, e sinuosidade dos movimentos. Serão utilizados modelos ocultos de Markov para identificar pontos com comportamento de alimentação no mar, como descrito em Michelot et al. (2016), os quais serão interpolados para identificação de áreas potenciais de alimentação. Além disso, serão estimadas e comparadas as áreas de alimentação antes e após o rompimento a partir da densidade de kernel (KDE - *Kernel Density Estimator*), uma forma não-paramétrica para estimar a função de densidade de probabilidade de uma variável aleatória.

A metodologia para contagem das aves marinhas deverá ser a de censo contínuo e instantâneo utilizando embarcação (Tasker et al., 1984), pois oferece as melhores estimativas de densidade relativa e absoluta das aves encontradas no mar (voando ou pousadas). Esse método pode fornecer uma estimativa valiosa da abundância de aves marinhas que forrageiam em uma determinada área ou estão associadas a colônias próximas. Ao longo de um ano de estudo, esse método deve fornecer uma medida de circunstâncias dos locais de alimentação, bem como de variações no uso destes locais. A distribuição e abundância das aves marinhas deverão ser obtidas através de censos embarcados trimestrais. A realização dos embarques trimestralmente, ao invés de embarques mensais realizados no primeiro ano, garante um delineamento amostral que contemple as variações das quatro estações meteorológicas do ano. As aves marinhas deverão ser identificadas através de guias específicos (Harrison, 1985; Onley e Scofield, 2007) e contadas através de censos contínuos e instantâneos segundo Tasker et al. (1984) e Gould e Forsell (1989), incluindo as aves seguidoras. A proposta de delineamento amostral anterior contemplava as prerrogativas de esforço do TR4, sendo executados, pelo menos, 07 transecções por estação do ano, sendo que cada transecção deveria ter ao menos 200 km de extensão. Avaliando os resultados preliminares obtidos durante as campanhas de censos em alto mar realizadas até o momento, a equipe técnica propõe ajustes desta malha amostral. A proposta de reduzir

cada transecção pela metade, para 100 km de extensão foi aprovado pelo CTBio ao final do primeiro ano, o início das transecções em profundidades menores, portanto mais próximos da costa. Esses ajustes garantiram que as áreas mais relevantes, adjacentes à área impactada e de elevada importância ecológica para as populações de aves, fossem bem amostradas, com redução substancial de custos e esforço amostral. Sete transecções com 100 km de extensão devem ser percorridos (2 ao sul, 4 ao norte e 1 na foz) e deverão ser 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 deverão ser realizados por pelo menos um ornitólogo com experiência na identificação das espécies de aves marinhas da região, 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, outra deverá ser iniciada após intervalo de 10 minutos. Aves seguidoras são aquelas que acompanham a embarcação durante a navegação, geralmente voando atrás do barco, e deverão ser contadas da popa. O censo contínuo deverá abranger 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 derrota do navio, excluindo as aves seguidoras. No censo instantâneo o tempo de contagem deverá ser dividido em intervalos consecutivos de duração fixa. Ao início de cada intervalo deverão ser 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 deverão ter duração de 10 minutos, e os censos instantâneos terão 10 intervalos consecutivos de 1 minuto. A posição do limite externo da faixa de censo deverá ser 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 deverá navegar a velocidade constante, com rumo conhecido, e que a linha do horizonte seja visível. A densidade de aves (número de aves/km²) deverá ser calculada com base nos resultados obtidos nos censos instantâneos, com referência a área total coberta em cada censo, sendo esta igual a 10 vezes a área varrida em cada contagem instantânea.

O monitoramento das aves nas praias do litoral do Espírito Santo será executado utilizando o método do “Itinerário Fixo” em trechos que a fisionomia da praia permita o tráfego de veículo, e “Pontos Fixos” em trechos que a fisionomia da praia não permita o tráfego de veículo (Branco et al., 2010), a ser percorrido por veículo motorizado e estabelecido pelo menos quatro trilhas a serem percorridas na praia, pelo menos uma vez a cada campanha mensal. Para as transecções de praia é preferível realizar as amostragens mensais, pois há maior variação das espécies presentes entre os dias. Cada trilha deve ter no mínimo 30 km. Duas devem seguir ao norte da foz (até o Degredo e Barra Seca), outra ao sul da foz (até Barra do Riacho) e uma última mais ao sul (15 km ao norte do Piraque-açu e 15 km ao sul). Também deve ser usado o método de “Contagem em Descanso” (Branco et al., 2010), haja vista existência de bancos

de areia às margens da foz e no estuário, que são utilizados como dormitório e área de descanso pelas aves. A metodologia de censo será complementada pelas metodologias internacionalmente aceitas, descritas em Bibby et al. (1997). Dados qualiquantitativos, como lista com identificação de espécies, status de ameaça de extinção e endemismo, guilda trófica, espécies indicadoras, área de vida, padrões de distribuição, abundância, riqueza e biodiversidade, serão analisados.

Os mapas de distribuição espacial da assembleia de aves marinhas no mar serão elaborados a partir dos dados de contagens de aves a partir de embarcação em sete transecções perpendiculares entre 10 e 100 km da costa na foz do Rio Doce e adjacências. De forma semelhante, os mapas de distribuição da assembleia de aves marinhas e costeiras nas praias serão elaborados a partir de contagens mensais de aves em 130 km de praias ao sul e norte da Foz do Rio Doce.

6.3. Meta 2 - Monitorar a utilização de recursos alimentares

Para realização das análises de uma forma abrangente serão utilizadas duas técnicas complementares: análise de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) e análise de material regurgitado de *Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster* e de Sternidae costeiros. Em Abrolhos, *P. aethereus* e *S. leucogaster* serão amostradas no período reprodutivo nas suas colônias, enquanto os Sternidae serão amostrados na foz do Rio Doce ou nas colônias localizadas nas ilhas costeiras de Vitória e Vila Velha (ES). Serão coletadas amostras de sangue e penas das aves vivas, e músculo das presas das aves marinhas regurgitadas durante o manuseio das aves. As amostras de músculo das presas serão lavadas em solução de éter de petróleo no condensador tipo Soxhlet para extração de lipídios, durante 3 sessões de 6 h cada. Após a secagem a 60°C por 72 h, as amostras serão maceradas até a obtenção de um pó homogêneo. Cerca de 0,9 mg de amostra será pesada e envelopada em cápsula de estanho. A determinação da composição isotópica dos elementos será feita em um espectrômetro de massa de razão isotópica acoplado a um analisador elementar para C e N. As razões isotópicas serão expressas pela notação delta em partes por mil, de acordo com: $\delta X = [(R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. As razões isotópicas do carbono e nitrogênio são expressas em relação ao padrão V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite) e ao nitrogênio atmosférico, respectivamente. Deverão ser utilizados materiais certificados de referência em todas as análises. Devido a presença de lipídio ser variável nos tecidos de animais e por apresentar valores depreciados em ^{13}C em relação a todo o corpo (Peterson e Fry, 1987), deverá ser calculado a relação C:N para verificar o conteúdo lipídico de cada amostra (Post et al., 2007). Caso parte das amostras apresente relação C:N maior do que 3,5, deverá ser feita a normalização matemática dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$, segundo a equação: $\delta^{13}\text{C}_{\text{normalizado}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{sem tratamento}} - 3,32 + 0,99 \times \text{C:N}$ (Post et al., 2007). As análises estatísticas terão enfoque bayesiano (Ellison, 2004), utilizando o pacote MixSIAR (Stable Isotope Analysis in R) (Stock e Semmens, 2013), no qual os modelos de mistura permitem inferir a composição de dieta a partir de várias fontes potenciais de alimento, o pacote SIBER para estimativa de amplitude do nicho trófico.

6.4. Meta 3 - Monitorar a contaminação de aves marinhas

Serão analisados os metais/elementos-traço Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As, de amostras de sangue, penas, presas e ovos (quando possível) de *P. aethereus*, *S. leucogaster* e Sternidae costeiros. *P. aethereus* e *S. leucogaster* serão amostradas no período reprodutivo nas suas colônias no arquipélago dos Abrolhos, enquanto os Sternidae serão amostrados na foz do Rio Doce ou nas colônias localizadas nas ilhas costeiras de Vitória e Vila Velha (ES). As amostras de material biológico das aves deverão ser previamente secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO₃) ultrapuro (Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. As amostras deverão ser então submetidas à digestão ácida em tubos plásticos tipo Eppendorf devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até sua completa digestão. As amostras de material biológico digerido deverão ser avolumadas a 1 mL com água tipo milli-q. Imediatamente antes da análise da concentração dos metais, as amostras deverão ser diluídas, conforme a necessidade, utilizando-se água tipo milli-q. As amostras de material biológico, preparadas conforme descrito acima, deverão ser analisadas, em triplicata, por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite acoplado (HR-CS- AAS; ContrAA 700 Analytik Jena, Alemanha). As concentrações dos metais no material biológico deverão ser expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido). 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, Brasil), 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 (National Research Council, Canadá) 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, conforme descrito anteriormente. A variação nas concentrações de elementos essenciais e não-essenciais em tecidos biológicos de espécies indicadoras será estimada a partir da análise da concentração de Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Pb, Zn, As e Hg em amostras de sangue, pena, e ovos de *Phaethon aethereus*, *Sula leucogaster* e Sternidae costeiros, bem como em presas regurgitadas por essas espécies.

6.5. Meta 4 - Monitorar a demografia e a reprodução de aves marinhas

A variação interanual no tamanho populacional de *Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster* no arquipélago dos Abrolhos e de *Sterna hirundinacea* nas ilhas costeiras de Vitória e Vila Velha (ES) serão obtidas a partir da contagem do número de ninhos ativos no pico da reprodução das espécies e posteriormente analisada em gráficos de tendência construídos com a base de dados temporal dos censos populacionais. As taxas de sucessos de eclosão e de reprodução de *Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster* serão obtidas a partir do monitoramento mensal de uma amostra de ninhos ativos no

arquipélago dos Abrolhos, enquanto as de *Sterna hirundinacea* serão obtidas durante o período de atividade reprodutiva da espécie nas ilhas costeiras de Vitória e Vila Velha (ES). O sucesso reprodutivo aparente será calculado através do método tradicional que leva em consideração o número de ovos que eclodiram dividido pelo número de ovos postos, para calcular o sucesso de eclosão e número de filhotes que deixaram o ninho dividido pelo número de ovos que eclodiram, para calcular o sucesso de filhote e, conseqüentemente, da reprodução. O sucesso reprodutivo de *Sterna hirundinacea* será estimado a partir da contagem de ovos e filhotes existentes no início e no final do período reprodutivo nas ilhas costeiras de Vitória e Vila Velha (ES).

6.6. Meta 5 - Monitorar a diversidade genética

As capturas das aves serão realizadas conforme metodologia descrita na Meta 1. Cerca de 300 amostras de sangue das aves de Abrolhos já foram coletadas em período anterior ao desastre ocorrido no Rio Doce. Os tecidos para as análises genéticas deverão ser armazenados em microtubos e conservados em álcool 70%. Para extração de DNA, serão utilizados kits específicos de extração. Ao final do processo, o DNA deverá ser ressuspensionado com a adição de 20 µL de água mili-q e armazenado na geladeira a 4°C. As amostras de DNA serão quantificadas em espectrofotômetro disponível no Instituto de Ciências Biológicas da FURG. O rápido desenvolvimento das técnicas de análise molecular, a redução dos custos e os resultados mais precisos, podem representar inúmeras vantagens sobre a técnica indicada inicialmente e, portanto, deve ser considerada como uma alternativa mais adequada para o monitoramento das populações de aves. Para isso, uma biblioteca genômica é construída utilizando a técnica de ddRADseq (*double digest restriction-site-associated DNA*) (Peterson et al. 2012), que faz uso de duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro e outra de corte frequente, com o objetivo de padronizar e otimizar o tamanho dos fragmentos gerados. São utilizados 4,0 µL de DNA (totalizando 200 ng), que são digeridos com 0,1 µL (1 U) das enzimas de restrição (Thermo Scientific) SdaI (corte frequente) e Csp6I (corte raro), respectivamente. Essas enzimas criam pontas coesivas em ambas as extremidades das moléculas de DNA digerida, que permitem a ligação aos adaptadores. O adaptador P1 (comum a todas as amostras) se liga à ponta gerada pela enzima SdaI e o adaptador AY 2,0 µL (*barcode* único de cada amostra) se liga à ponta gerada pela enzima Csp6I. Estes adaptadores se ligam inicialmente por pontes de hidrogênio à molécula de DNA digerida. A enzima T4 ligase 0,5 µL (5 U), permite a ligação fosfodiéster com o auxílio de 0,5 µL ATP (5 mmol) e 5 µL Tampão Tango 10X. As condições do tempo de digestão serão conforme especificações do fabricante. Na etapa de enriquecimento as condições de PCR ocorreram em volume final de 25 µL, sendo 12,4 µL de H₂O, 2,0 µL MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTPs (10 mM), 2,5 µL de tampão NH₄ SO₄ 10X (Fermentas), 2,5 µL de *primer* P1 (2 mM), 2,5 µL de *primer* A-amp (2 mM), 0,1 µL de Taq (0,5 U KlenTaq DNA Polymerase Technology) e 1 µL de DNA digerido. As reações de PCR ocorrem em um ciclo inicial de 68°C por 1 minuto seguido por 18 ciclos iniciando a 93°C por 10 segundos, 52°C por 35 segundos, 68°C por 1 min e 30 segundos e um ciclo final e único de 68°C por 7 minutos. Após o término, as amostras serão purificadas em coluna do kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification kit (Ge Healthcare Life Science, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, todas as amostras

contribuirão de forma equimolar para a formação de um pool genômico em um único tubo, as quais serão designadas para corte e seleção dos fragmentos alvos a serem sequenciados. Estes serão definidos por modelos computacionais no programa R, que levam em consideração um genoma completo como referência (aqui, serão utilizadas genomas de *Phaethon aethereus*, *Sula leucogaster*, ou espécies filogeneticamente próximas), depositadas no GenBank. Esta etapa será realizada no seletor de fragmentos em gel de agarose 2% Pippin Prep (Sage Science), em parceria já estabelecida com o Prof. Dr. Tomas Hrbek, coordenador do Laboratório de Evolução e Genética Animal, da Universidade Federal do Amazonas. Após a construção da biblioteca, serão seguidas as recomendações dos fabricantes para o sequenciamento no sequenciador Ion Torrent (PGM, Life Technologies) com a utilização do kit de sequenciamento 318 Ion PGM chip de 400 pb. Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de *Bottleneck* (efeito gargalo) deverá ser realizado utilizando o software *Bottleneck* v. 1.2.02 (Cornuet e Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional deverá ser realizada uma análise de *cluster* bayesiana a fim de 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, deverá ser realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa *Arlequin* v.3.11. Também deverão ser calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população, e índices de estruturação da população, por meio dos programas *Genepop on the Web* (<http://wbio.med.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 ($P \leq 0,05$). Estimativas de tamanho efetivo da população serão realizadas no software *OneSamp* v.2, considerando sistema monogâmico de acasalamento e frequência alélica de 0,02 como ponto de corte. Serão ainda ajustados GLMs bayesianos no programa *GESTE*, e análise de ordenamento a partir de análises de redundância no programa R (pacote *vegan*), para determinar quais variáveis ambientais influenciam na variabilidade genéticas das populações.

6.7. Meta 6 - Monitorar parâmetros sanitários de aves marinhas

A presente proposta objetiva avaliar a sanidade das aves, com exames hematológicos (Hematoscopia, relação H:L e pesquisa de hemoparasitas,), pesquisa molecular de agentes infecciosos e parasitários como *Borrelia* sp., *Anaplasma* sp., e *Babesia* sp., entre os principais, e pesquisa microbiológica de cloaca e orofaringe com cultura, isolamento e antibiograma. Para tanto serão obtidas amostras de sangue e suabes de todas as aves que forem manipuladas tanto nas capturas a bordo quanto no monitoramento. 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) convencional e Tempo Real e posterior 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 até

processamento no laboratório (cultura, isolamento das bactérias e antibiograma). Estas amostras também poderão ser utilizadas no sequenciamento em massa (metagenômica) para identificação da presença dos patógenos de escolha ou até mesmo multirresistência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., et al. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS One* 3:e3376.

Becker P.H., 2003. Biomonitoring with birds. Trace Metals and Other Contaminants in the Environment. Elsevier, pp. 677–736.

Bibby C.J., Burgess N.D., Hill D.A. 1997. Bird census techniques. Academic Press, London.

Branco J.O., Barbieri E., Fracasso H.A.A. 2010. Técnicas de pesquisa em aves marinhas. Pp. 219–235, In: Ornitologia e Conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. von Matter S., Straube F.C., Cândido-Jr J.F., Piacentini V., Accordi I. (eds.). Technical Books Editora, Rio de Janeiro.

Carneiro A.P.B., Pearmain E.J., Oppel S., Clay T.A., Phillips R.A., Bonnet-Lebrun A., et al. 2020. A framework for mapping the distribution of seabirds by integrating tracking, demography and phenology. *Journal of Applied Ecology* 57:514–525.

Charbonnel E., Daguin-Thiébaud C., Caradec L. et al. 2022. Searching for genetic evidence of demographic decline in an Arctic seabird: beware of overlapping generations. *Heredity* 128:364–376.

Chazar A., Loiseau C., Valkiunas G., Iezhova T., Smith T.B., Sehgal R.N.M. 2009. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology* 18:4121–4133.

Clutton-Brock T., Sheldon B.C. 2010. Individuals and populations: the role of long-term, individual-based studies of animals in ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 25:562–573.

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.

Diamond A.W., Devlin C.M. 2003. Seabirds as indicators of changes in marine ecosystems: ecological monitoring on Machias Seal Island. *Environmental Monitoring and Assessment* 88:153–175.

Durant J., Hjermann D., Frederiksen M., Charrassin J., LeMaho Y., Sabarros P., Crawford R., Stenseth N., 2009. Pros and cons of using seabirds as ecological indicators. *Climate Research* 39:115–129.

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

Friend M., Thomas N. 1992. Disease prevention and control in endangered avian species: special considerations and needs. *Acta Congressus Internationalis Ornithologici* 20:2331–2337.

Gennari S.M., Soares H.S., Niemeyer C., Catão-Dias J.L., Musso C.M., Siqueira G.C.C., Dubey J.P.

2013. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves marinhas do arquipélago de Abrolhos-Bahia, Brasil. In: I Wildlife Disease Association Latin America, São Paulo.

Karesh, W.B. et al. 1997. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28:368–377.

Goudet J. 2001. FSTAT, version 2.9.3: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Lausanne.

Gould P.J., Forsell D.J. 1989. Techniques for shipboard surveys of marine birds. Pp.1–23. Washington, D.C., Fish and Wildlife Service 25.

Harrison P. 1985. Seabirds, an identification guide. Houghton Mifflin, Boston.

Heinemann D. 1981. A range finder for pelagic bird censusing. *Journal of Wildlife Management* 45:489–493.

Lavoie R.A., Baird C.J., King L.E., Kyser T.K., Friesen V.L., Campbell L.M., 2014. Contamination of mercury during the wintering period influences concentrations at breeding sites in two migratory piscivorous birds. *Environmental Science & Technology* 48:13694–13702.

Margalida A. 2017. Importance of long-term studies to conservation practice: the case of the bearded vulture in the Pyrenees. In Catalan J., Ninot J.M., Mercè-Aniz M. (eds.). *High mountain conservation in a changing world*, Pp. 343–383. Springer, Cham.

Mesak F., Tatarenkov A., Earley R.L., Avise J.C. 2014. Hundreds of SNPs vs. dozens of SSRs: which dataset better characterizes natural clonal lineages in a self-fertilizing fish? *Frontiers in Ecology and Evolution* 2:74.

Nelson J.B. 2005. Pelicans, cormorants, and their relatives: The Pelecaniformes. Oxford University Press, New York.

Niemeyer C., Musso C.M., Siqueira G.C.C., Catão-Dias J.L. 2013. Weights, hematology and plasmatic chemistry of free-ranging *Phaeton* tropical pelagic seabirds. In: I Wildlife Disease Association Latin America, São Paulo.

Nunes G.T., Bugoni L. 2018. Local adaptation drives population isolation in a tropical seabird. *Journal of Biogeography* 45:332–341.

Nunes G.T., Efe M.A., Barreto C.T., Gaiotto J.V., Silva A.B., Vilela F., Roy A., Bertrand S., Costa P.G., Bianchini A., Bugoni L. 2022. Ecological trap for seabirds due to the contamination caused by the Fundão dam collapse, Brazil. *Science of the Total Environment* 807:151486.

Onley D., Scofield P. 2007. Field guide to the albatrosses, petrels and shearwaters of the world. Christopher Helm Publishers Ltd, London.

Parsons M., Mitchell I., Butler A., Ratcliffe N., Frederiksen M., Foster S., Reid J.B. 2008. Seabirds as indicators of the marine environment. *ICES Journal of Marine Science* 65:1520–1526.

Phillips R.A., Waluda C.M., 2020. Albatrosses and petrels at South Georgia as sentinels of marine debris input from vessels in the southwest Atlantic Ocean. *Environmental International* 136:105443.

Peterson B.J., Fry B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review on Ecology and Systematics* 18:293–320.

Peterson B.K., Weber J.N., Kay E.H., Fisher H.S., Hoekstra H.E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7:e37135.

Phillips, R.A., Waluda, C.M., 2020. Albatrosses and petrels at South Georgia as sentinels of marine debris input from vessels in the southwest Atlantic Ocean. *Environ. Int.* 136, 105443

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.

Shivaprasad H.L. 2002. Pathology of birds – an overview. C.L. Davis Foundation Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals, AFIP, Washington, DC.

Siciliano S., Alves V., Hacon S. 2005. Aves e mamíferos marinhos como sentinelas ecológicas da saúde ambiental: Uma revisão do conhecimento brasileiro. *Cadernos Saúde Coletiva* 13:927–946.

Signa G., Mazzola A., Vizzini S. 2021. Seabird influence on ecological processes in coastal marine ecosystems: An overlooked role? A critical review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 250:107164.

Stock B.C., Semmens B.X. 2013. MixSIAR GUI user manual, version 1.0. Disponível em: <http://conserver.iugo-cafe.org/user/brice.semmens/MixSIAR>.

Strøm H, Descamps S, Ekker M, Fauchald P, Moe B. 2021. Tracking the movements of North Atlantic seabirds: steps towards a better understanding of population dynamics and marine ecosystem conservation. *Marine Ecology Progress Series* 676:97–116.

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.

Weimerskirch H. 2018. Linking demographic processes and foraging ecology in wandering albatross—Conservation implications. *Journal of Animal Ecology* 87:945–955.

MONITORAMENTO REMOTO DA MEGAFauna MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Agnaldo Silva Martins	Coordenador	UFES
João Batista Teixeira	Pesquisador (pós-doc)	UFES
Amanda Baron Di Giacomo	Pesquisador (celetista)	UFES
Jonathas da Silva Barreto	Pesquisador (celetista)	UFES
Nelson Barcelos	Pesquisador (celetista)	UFES
Jordana Borini Freire	Pesquisador (celetista)	UFES
Daniel Von Sperling Venturini	Pesquisador (celetista)	UFES
Thamires Bride	Iniciação científica	UFES
César Xavier	Iniciação científica	UFES
Maria Eduarda Fonseca	Iniciação científica	UFES
Ana Júlia Oliveira Vianna	Iniciação científica	UFES
Marcos Eduardo Dias Rocha	Iniciação científica	UFES

2. ESCOPO

Dronemonitoramento de longo alcance da megafauna marinha a partir de sobrevoos não-tripulados com a utilização de Drones tipo asa-fixa. O monitoramento ocorrerá de forma sistemática trimestralmente, até 20 km de distância da costa, entre a foz do rio Piraquê-Açu, em Aracruz, e o limite norte do Espírito Santo, em Conceição da Barra. Ressalta-se que essa metodologia, uma vez implementada, substituirá com vantagens na gestão (uma única instituição executora), economicamente (menor custo), periodicidade padrão e maior capacidade de integração, cinco metodologias até então empregadas no contexto do TR4 (dronemonitoramento de curto alcance, sobrevoos tripulados, bioacústica, ponto fixo e observação embarcada). Nas áreas consideradas hotspot para a megafauna serão mantidos os esforços de ROV-mapeamento de habitats para análises da evolução da integridade ambiental.

3. OBJETIVO

Conhecer a distribuição e abundância da megafauna marinha que ocupa a área sob influência da pluma de sedimentos do rio Doce. Entender a estrutura populacional e as estratégias de uso de habitat desenvolvidas nesse ambiente, principalmente, pelos pequenos cetáceos, com foco na toninha. Analisar a integridade dos ambientes mais importantes para a vulnerabilidade da megafauna.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1 – Determinar a abundância relativa e distribuição da megafauna marinha

A região da foz do Rio Doce mostrou-se extremamente importante para diversas espécies da megafauna marinha (GIACOMO *et al.*, 2021). Durante o dronemonitoramento costeiro foram registrados mais de 5.000 grupos de megafauna marinha distribuídos em 14 espécies (RRDM, 2022). A megafauna marinha que ocupa a região impactada pelo rejeito de minério é diversa (Barreto *et al.*, 2021), e, em grande parte ameaçada de extinção (BARRETO *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2019; COLMAN *et al.*, 2019). O uso de surrogates, ou indicadores de biodiversidade, é uma alternativa para selecionar áreas de conservação não aleatoriamente a partir de um componente de biodiversidade útil (SARKAR *et al.*, 2005) e a megafauna pode ser utilizada como indicador de qualidade ambiental. Por serem animais de grande porte, topo de cadeia alimentar, com maturação tardia e ciclo de vida longo, essas espécies podem servir como sentinelas do ambiente que ocupam. Portanto, saber a quantidade de indivíduos das populações é fundamental para entender a vulnerabilidade dessas espécies e dos ambientes que ocupam.

META 2 – Determinar a abundância absoluta da população de toninha

A toninha (*Pontoporia blainvillei*) é uma espécie de pequeno cetáceo endêmica do Atlântico Sul Ocidental (ASO), considerada a mais ameaçada pelos cientistas na área, principalmente, devido ao *bycatch* em pescas de emalhe (SECCHI, 2010). A degradação do habitat também é uma ameaça importante à sobrevivência das franciscanas (LAILSON-BRITO *et al.*, 2011), assim como a recente identificação de metais pesados e organoclorados em indivíduos que utilizam a foz do rio Doce (MANHÃES *et al.*, 2022; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2022). A toninha encontra-se classificada como 'vulnerável' na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção da IUCN (ZERBINI *et al.*, 2017) e Criticamente Em Perigo na Lista Vermelha brasileira (MMA, 2014). Uma análise recente de mtDNA sugeriu que os indivíduos encontrados na faixa norte do ES representam uma população isolada geneticamente (CUNHA *et al.*, 2014), além de geograficamente (SUCUNZA *et al.*, 2021), tornando essa a população mais ameaçada da toninha, chamada de Franciscana Management Areas (FMA Ia). Por isso, determinar o número absoluto de indivíduos dessa população é fundamental para desenvolver estratégias para a conservação dessa espécie.

META 3 – Verificar o uso do habitat e a estrutura populacional da megafauna marinha

O uso de tecnologias disruptivas e o monitoramento sistemático permitiram compreender a dinâmica local das populações, as preferências de uso do habitat e acessar informações não fornecidas pelos métodos tradicionais (GIACOMO *et al.*, 2021). A megafauna marinha usa diferentes ambientes de diferentes formas. A presença de filhotes e indivíduos jovens podem representar ambientes importantes para a reprodução e desenvolvimento de algumas espécies, assim como, comportamentos de forrageio indicam a presença de recursos alimentares importantes para toda a cadeia alimentar. Entender o uso dos ambientes marinhos pela megafauna é uma ferramenta importante para a gestão dos espaços e mitigação dos impactos.

META 4 – Aferir a integridade dos ecossistemas em ambientes hotspots para megafauna

Conhecer os ambientes que representam picos de abundância para megafauna marinha permite o estabelecimento de uma rede de áreas marinhas protegidas voltadas para ecossistema marinho baseadas na distribuição de hotspots (REYERS *et al.*, 2000; GASTON & RODRIGUES, 2003). Análises de vídeo-amstras subaquáticas captadas com ROV (*Remotely Operated Underwater Vehicle*) têm se mostrado útil para descrição de micro-habitat, auxiliando no entendimento das relações ecológicas, principalmente em áreas de agregação de megafauna marinha (GIACOMO *et al.*, 2021). Identificamos sete tipos de fundo representando habitats marinhos distintos utilizados pela megafauna: lama; areia; areia com fragmentos; areia e lama; briozoários, esponjas e algas; estruturas recifais; rodolitos (GIACOMO *et al.*, 2021). Estes ambientes são monitorados desde 2019, sendo necessária a continuidade das vídeo-amstragens para poder analisar a integridade dos mesmos. Com a coleta nos anos de 2023 e 2024 serão totalizados 5 anos de monitoramento, o que permitirá aferir o quanto os hotspots para megafauna foram impactados e o quanto se recuperaram ao longo desse período.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Posições geográficas (lat/long) de cada grupo de megafauna avistado; - Trechos de vídeos da megafauna marinha identificada; - Banco de dados com registro de esforço sistematizado.	Agnaldo Martins

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Abundância relativa da megafauna marinha; - Distribuição e densidade da megafauna marinha; - Abundância absoluta de toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>); - Estrutura populacional e uso do habitat da megafauna marinha; - Análise de integridade dos ambientes hotspot para megafauna.	Agnaldo Martins

6. METODOLOGIA

6.1. Malha e frequência amostral

- Transição metodológica

Durante o ano de 2022 (de agosto a janeiro) será mantido o esforço do Dronemonitoramento Costeiro, o qual está sendo desenvolvido sistematicamente desde dezembro de 2018 (BARRETO *et al.*, 2021). O monitoramento será mantido nos três (03) pontos de decolagem originais (Piraquê-Açu, Comboios e Foz do Rio Doce), com esforço mensal total de 30 voos (RRDM, 2022), conforme desenho amostral da Figura 17. A partir dos dados desse monitoramento serão realizadas análises que permitirão desenvolver a nova metodologia de dronemonitoramento de longo alcance, a qual ocorrerá no período de agosto a janeiro de 2022, período necessário para aquisição dos drones de asa fixa necessários

para a nova metodologia, treinamento e certificação da equipe para os novos equipamentos e testes de campo. O tempo de disponibilidade de observação dos cetáceos, por exemplo, será utilizado para corrigir o número de observações realizadas a partir do novo método: Dronemonitoramento de Longo Alcance (item 6.2).

Durante este período serão realizados os testes metodológicos necessários para a evolução amostral. O desenho amostral do Dronemonitoramento de Longo Alcance será desenvolvido de forma a manter a malha amostral similar aos Sobrevoos Tripulados executados entre 2019 e 2022. A periodicidade seguirá o padrão estabelecido para os demais temas do PMBA, que obedecerá a datas pré-determinadas e esforço trimestral. Desta forma, em janeiro de 2023 serão realizados os primeiros sobrevoos não-tripulados, podendo (ou não) ser considerada a primeira campanha desta evolução metodológica. Em abril de 2023 iniciará a nova amostragem sistemática, descrita no **item 6.2**. Os prazos poderão ser antecipados a depender de fatores que não estão sob controle da equipe técnica, tais como, tempo de aquisição e entrega dos novos equipamentos e de obtenção das autorizações necessárias dos órgãos de controle.

- Dronemonitoramento de longo alcance

O esforço será realizado **trimestralmente**, com duração de 10 dias de campo cada campanha, totalizando 6 campanhas ao longo dos 18 meses subsequentes. A malha amostral será desenhada para cobrir de forma homogênea e aleatória toda a área de interesse, desta forma, serão desenhados transectos para dronemonitoramento sistemático da megafauna marinha em áreas costeiras e pelágicas. A amostragem prioriza a espécie de pequeno cetáceo mais ameaçado de extinção que utiliza a área de estudo: a toninha (*Pontoporia blainvillei*). A área de estudo, portanto, será entre a foz do rio Piraquê-Açu e Itaúnas. Serão realizados aproximadamente 80 transectos lineares perpendiculares à costa, totalizando aproximadamente 1800 km percorridos cobrindo uma área aproximada de 3.500 km² varrida com esforços de observação (Figura 18).

- ROV-mapeamento de habitats

O desenho amostral para vídeo-amostragem com ROV (*Remotely Operated Underwater Vehicle*) baseou-se nos dados obtidos pelos outros monitoramentos do PMBA (GIACOMO *et al.* 2021). A partir das informações parciais destes monitoramentos, foram escolhidos pontos representativos das áreas de agregação da megafauna marinha na área de amostragem, entre os municípios de Aracruz e Conceição da Barra no norte do Espírito Santo (Figura 19).

As amostragens ocorrerão em campanhas de 15 dias de duração, uma vez a cada ano. Estão previstas duas campanhas para o período de monitoramento da presente proposta de trabalho.

Figura 17: Área varrida pelo Dronemonitoramento a ser realizado no período de transição metodológica. Mesma região amostrada desde o 2018.

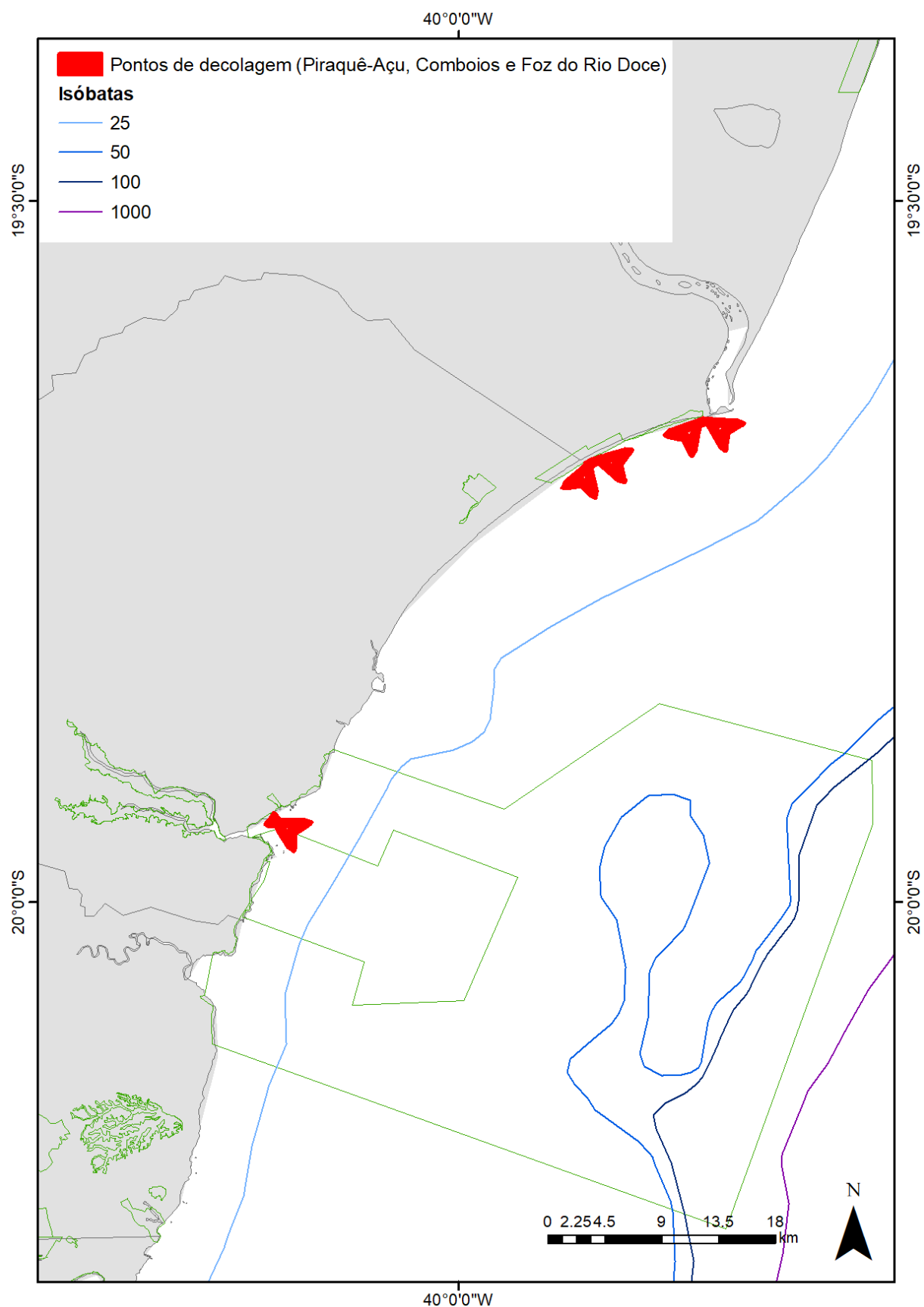


Figura 18: Área varrida pelo Dronemonitoramento de Longo Alcance, fora do alcance visual (BVLOS - *Beyond Visual Line-Of-Sight*). Área sujeita à alteração após a realização dos experimentos pilotos.

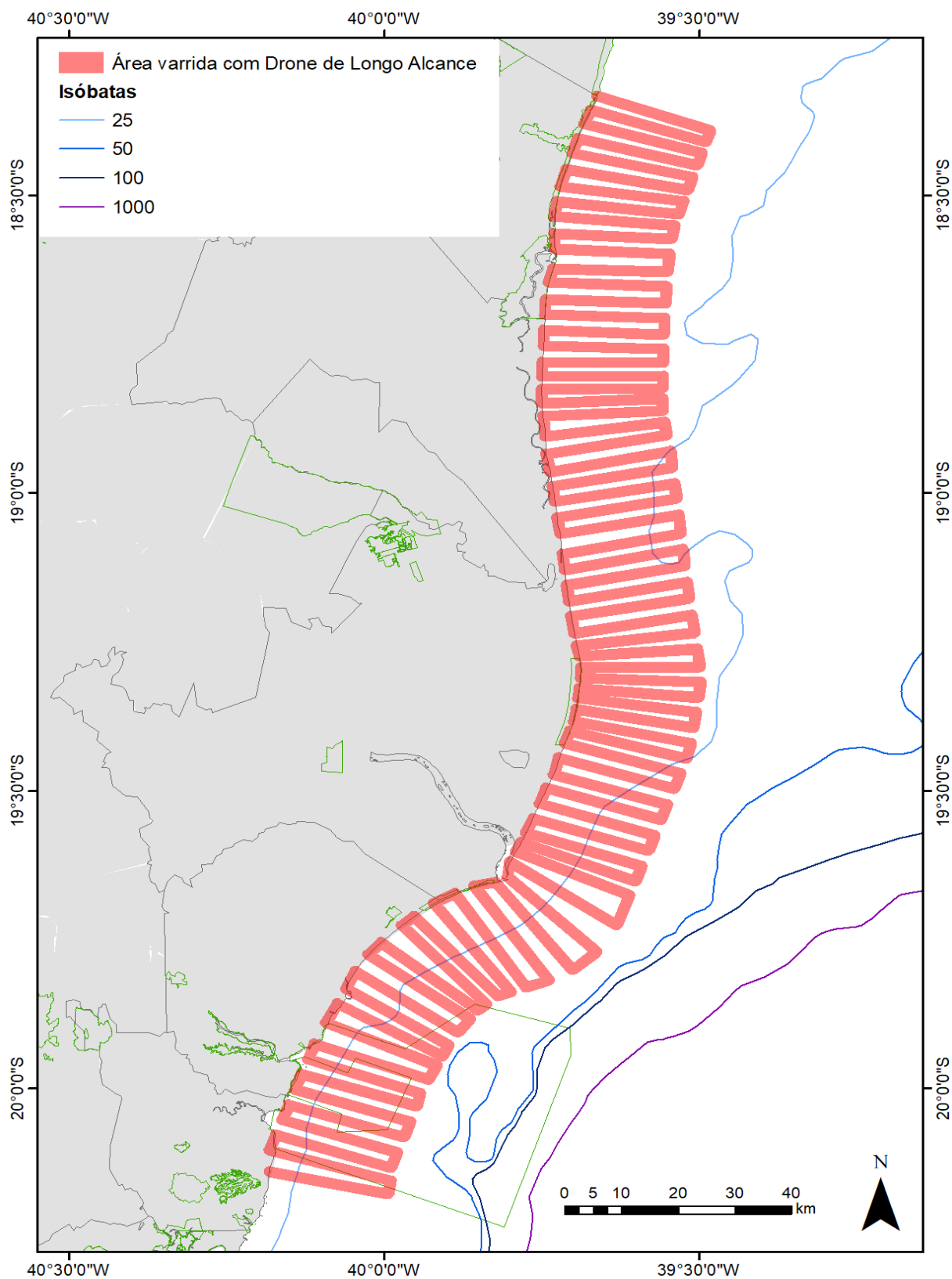
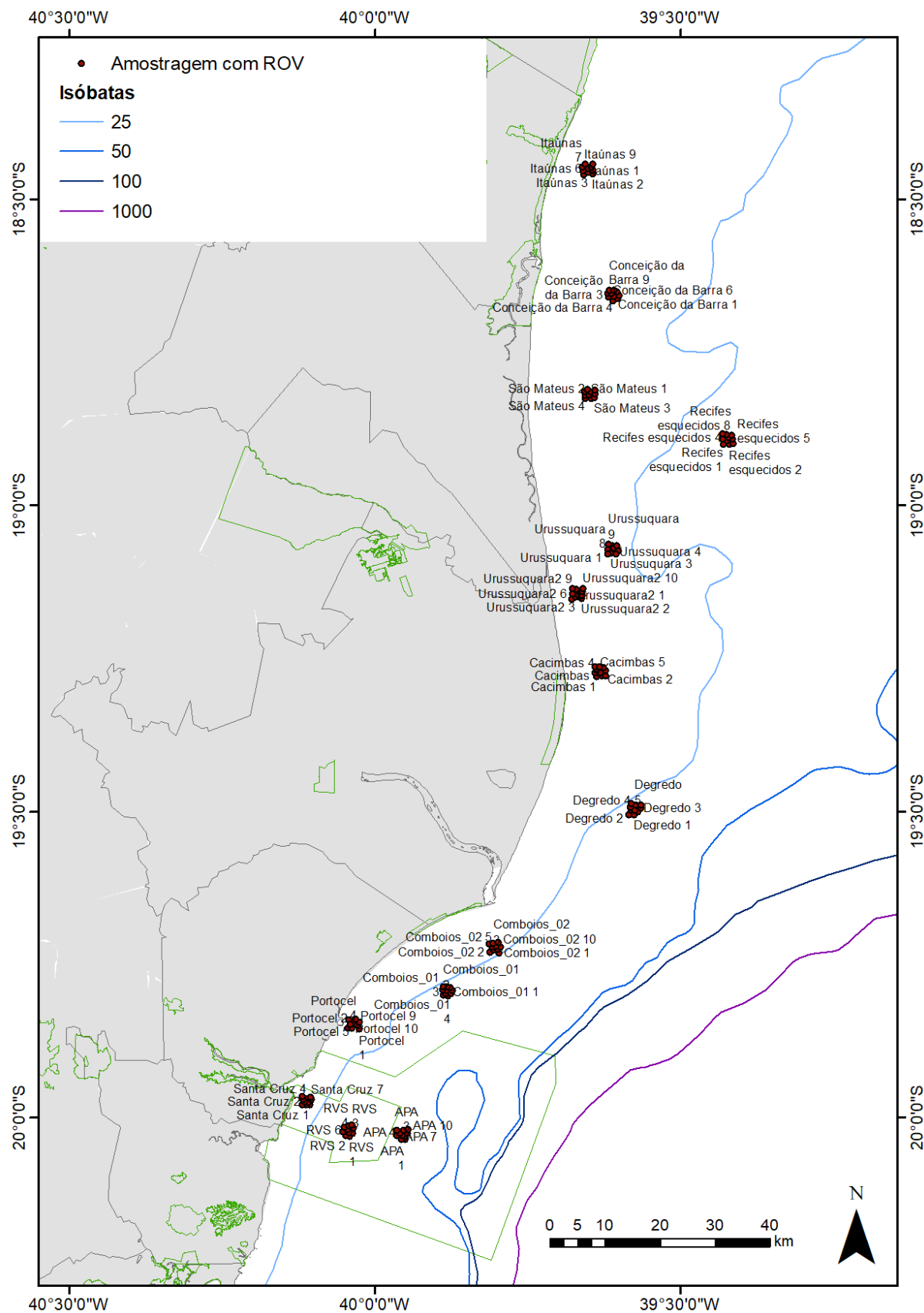


Figura 19: Pontos de amostragem com ROV. Em cada ponto, de seis a 10 réplicas de vídeo amostras do fundo são realizadas com distância mínima de 500m uma da outra



6.2. Dronemonitoramento de longo alcance

A detectabilidade da megafauna marinha foi testada e validada nos primeiros anos de monitoramento do PMBA (BARRETO *et al.*, 2021). A partir de novos testes metodológicos, serão realizadas adaptações no padrão de voo (como a altura do voo, ângulo da câmera, velocidade de voo e a posição dos transectos) para abranger uma área maior do realizado entre outubro de 2018 e dezembro de 2022, alcançando, assim, áreas mais profundas e distantes. Para realização das coletas da vídeo-amostra serão necessários 4 pesquisadores em campo, com o uso de um Drone asa-fixa, modelo Nauru 500c, uma tela para acompanhamento em tempo real, máscara FPV para pilotagem, e uma camionete 4x4 e um veículo furgão/van para logística. Serão realizados aproximadamente 6 voos por dia de campo, com distância máxima do ponto de decolagem de 35km, e distância máxima da costa de 20km. Para cada operação do Drone deverá ser obtida uma autorização do Departamento de Controle do Espaço Aéreo de acordo com instruções contidas na Circular de Informações Aeronáuticas (AIC- N21/10) de 23 de setembro de 2010. A equipe que pilotar os RPAs (*Remotely Piloted Aircraft System*), Drones, deverá estar previamente registrada na ANAC.

Abundância relativa da megafauna marinha

Durante os voos não tripulados, além do piloto e copiloto do drone, outros dois pesquisadores estarão posicionados dentro de um automóvel van, com um monitor de 24" para visualização simultânea do voo. Uma dupla de pesquisadores acompanhará a operação com um veículo 4x4, o qual auxiliará nos locais de difícil acesso. Durante os transectos de observação a aeronave deverá voar a uma altitude e velocidade constante: entre 100 e 200m de altura; e entre 40 e 80km/h. As vídeo-amostras serão analisadas em laboratório para validação da identificação da megafauna previamente realizada em campo.

Em cada registro de megafauna marinha serão registrados: hora/minuto/segundo, a espécie (ou Família), o tamanho do grupo, presença de filhotes e juvenis, e comportamento (quando possível). Caso não seja possível determinar a espécie *in loco*, as confirmações serão feitas em laboratório durante a análise das vídeo-amostras. A localização geográfica também será registrada durante a visualização, ou a partir da legenda gravada no vídeo coletado.

Para avaliar a distribuição espacial das espécies serão realizadas modelagens espaciais. A densidade das espécies e as suas abundâncias relativas serão calculadas para aquelas espécies que tenham volume amostral suficiente e probabilidade de detecção conhecida. Todas as análises serão realizadas no pacote estatístico R Project (R Development Core Team, 2008) e representadas em boxplot, gráficos percentuais ou pontos de médias com erro padrão associados. O teste estatístico aplicado será o Mann-Whitney, não paramétrico para duas amostras independentes ao nível de 0,05 de significância (ZAR, 1984).

Abundância absoluta da toninha

A partir dos dados previamente coletados pelo dronemonitoramento costeiro da megafauna marinha (PMBA/RRDM), realizado entre outubro de 2018 e junho de 2022, serão avaliados os tempos de

mergulho e frequência respiratória, para determinar o tempo de disponibilidade da toninha na superfície marinha. Para tal, serão analisados os registros dos voos dos drones, os quais contém o tempo (hora/minuto/segundo) e a localização do equipamento no momento do registro, capturados pelo Sistema Global de Navegação por Satélite (GNSS).

Todas as avistagens de toninha registradas durante o novo modelo de dronemonitoramento da megafauna marinha (Dronemonitoramento de Longo Alcance), a iniciar-se no primeiro semestre de 2023, serão contabilizadas e corrigidas para aqueles grupos aos quais não foram passíveis de identificação. Desta forma, a partir de uma amostragem trimestral, será possível estimar a quantidade de indivíduos de toninhas disponíveis em cada uma das campanhas.

Uso do habitat e estrutura populacional da megafauna

Para o grupo dos cetáceos, serão identificados as espécies e o número de animais encontrados em cada observação. Para análise de estrutura social são analisados o tamanho médio (também o máximo, o mínimo) dos grupos e sua composição sendo os indivíduos classificados como filhotes, juvenis e adultos (a partir da análise dos vídeos e comparação do tamanho corporal entre os espécimes do mesmo grupo).

O comportamento (divididos primariamente em: deslocamento, alimentação e interação) deverá ser registrado sempre que possível. Durante o Dronemonitoramento de Longo Alcance realizado com o Drone asa-fixa (Nauru 500c - zoom de 30x, gimbal 360o), sempre que se perceber viável e interessante, serão realizados sobrevoos circulares (com raio de 1,5 km) ao redor do grupo de megafauna para registro de comportamentos. Além destes voos não tripulados com drones de asa-fixa, serão também realizados esforços de dronemonitoramento exploratório com Drones quadricópteros (Mavic 2 Zoom) concomitantes aos embarques para mapeamento dos habitats (item 6.2), na área de maior abundância da toninha. Esses esforços exploratórios serão semestrais e permitirão a coleta de vídeo-amostras específicas para análises comportamentais.

6.3. ROV-mapeamento de habitats

O desenho amostral para vídeo-amostragem com ROV (*Remotely Operated Underwater Vehicle*) baseou-se nos dados obtidos pelos outros monitoramentos do PMBA (GIACOMO *et al.* 2021). A partir das informações parciais destes monitoramentos, foram escolhidos pontos representativos das áreas de agregação da megafauna marinha na área de amostragem, entre os municípios de Aracruz e Conceição da Barra no norte do Espírito Santo.

Durante o período de boa visibilidade da água são realizadas campanhas de mergulhos com veículos remotamente pilotados. Nesta operação, é realizado um transecto de 100m de comprimento, navegando linearmente. A distância é calculada a partir do momento que o equipamento toca o fundo, utilizando as marcações de metragem que contém no cabo umbilical do ROV e um GPS subaquático.

O modelo BlueROV2, da fabricante *Blue Robotics*, foi considerado o mais apropriado devido a

capacidade para operações em águas rasas a moderadas, com uma classificação de profundidade padrão de 100m e comprimentos de corda de até 300m disponíveis, com filmagem em Full HD. O equipamento é pilotado com um controle remoto conectado a um computador, em que o operador do ROV visualiza o que está a frente do equipamento durante o deslocamento no transecto, enquanto fala sobre os eventos para que um anotador que registra a hora do evento e o ponto exato de cada ambiente ou registro de fauna e flora.

Integridade dos hotspots marinhos

Cada mergulho realizado representa uma vídeo-amostra, a qual deverá ser analisada em laboratório. Durante a análise dos vídeos, o tempo de vídeo será registrado com o objetivo de obter o esforço amostral. Após a detecção do tempo (hora/minuto/segundo) de vídeo com registro de fauna e habitat, é feita uma edição do vídeo, com um recorte somente do momento da observação. A identificação dos tipos de habitats é feita a partir do substrato predominante ou dos organismos predominantes, com o objetivo de identificar e descrever os tipos de fundo nas regiões com registros de comportamento alimentar da megafauna, ou demais áreas de agregação. Os substratos são classificados em sete (07) morfotipos: areia; areia e lama; areia com fragmentos de conchas calcárias; estruturas recifais; briozoários/esponjas e algas; lama; e rodólitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, J. *et al.* Reproductive Longevity of the Loggerhead Sea Turtle, *Caretta caretta*, in Espírito Santo, Brazil. Marine Turtle Newsletter, v. 157, p. 10. 2019.
- BARRETO, J., CAJAÍBA, L., TEIXEIRA, J.B.; NASCIMENTO, L., GIACOMO, A., BARCELOS, N., FETTERMANN, T., MARTINS, A. Drone-Monitoring: Improving the Detectability of Threatened Marine Megafauna. Drones 2021, 5, 14. 2021.
- COLMAN L.P., THOMÉ J.C.A., ALMEIDA A.D.P., BAPTISTOTTE C. *et al.* Thirty years of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting in Espírito Santo, Brazil, 1988-2017: reproductive biology and conservation. Endang Species Res 39:147-158. 2019.
- CUNHA, H. A., MEDEIROS, B. V., BARBOSA, L. A., CREMER, M. J., MARIGO, J., LAILSON-BRITO, J., ... SOLÉ-CAVA, A. M. Population structure of the endangered franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing management units. PLoS ONE, 9(1), e85633. 2014.
- GASTON, K.J., RODRIGUES, A.S.L. Reserve selection in regions with poor biological data. Conservation Biology 17: 188–195. 2003.
- GIACOMO, A., BARRETO, J. TEIXEIRA, J.B. CAJAÍBA, L., BARCELOS, N., NASCIMENTO, L., JOYEUX, J.C., AND MARTINS, A. Using drones and ROV to assess the vulnerability of marine megafauna to the Fundão tailings dam collapse. Science of The Total Environment. 2021.

LAILSON-BRITO, J., DORNELES, P.R., AZEVEDO-SILVA, C.E., AZEVEDO, A. DE F., VIDAL, L.G., MARIGO, J., BERTOZZI, C., ZANELATTO, R.C., BISI, T.L., MALM, O., TORRES, J.P.M. Organochlorine concentrations in franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, from Brazilian waters. *Chemosphere* 84, 882–887. 2011.

MANHÃES *et al.* Temporal trends of trace elements bioaccumulation by a vulnerable cetacean (*Pontoporia blainvillei*) before and after one of the largest mining disasters worldwide. 2022.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Lista nacional oficial de espécies da fauna ameaçada de extinção - Mamíferos, aves, répteis, anfíbios e invertebrados terrestres, Portaria MMA no. 444, de 17 de dezembro de 2014, Brasil. 2014.

OLIVEIRA-FERREIRA N., MANHÃES B.M.R., *et al.* Franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, as environmental sentinels of the world's largest mining disaster: Temporal trends for organohalogen compounds and their consequences for an endangered population. *Environ Pollut.* 2022.

PINHEIRO *et al.* Opportunistic Development and Environmental Disaster Threat Franciscana Dolphins in the Southeast of Brazil. *Conservation Letter. Tropical Conservation Science.* Volume 12: 1–7. 2019.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM - Síntese integrativa entre ambientes. RT-39E, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 150 pag. 2022.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2018.

REYERS, B., VAN JAARSVELD, A.S., KRUGER, M. Complementarity as a biodiversity indicator strategy. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 267: 505–513. 2020.

SARKAR S. *et al.* Effectiveness of environmental surrogates for the selection of conservation area networks. *Conservation Biology*, 19:815-825. 2005.

SECCHI E. R. Review on the threats and conservation status of franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae). In M. Ruiz-Garcia & J. M. Shostell (Eds.), *Biology, evolution and conservation of river dolphins within South America and Asia* (pp. 323–339). New York, NY: Nova Science Publishers Inc.. 2010.

SUCUNZA *et al.* Population size and IUCN Red Listing of the isolated northern population of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*). *IWC* 2020. 2021.

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 5th ed., 944 p. 2010.

ZERBINI, A.N., SECCHI, E., CRESPO, E., DANILEWICZ, D., & REEVES, R. *Pontoporia blainvillei*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2017.

ANEXO

AVALIAÇÃO INTEGRADA DA

BIODIVERSIDADE AQUÁTICA DO BAIXO RIO

DOCE E ÁREA COSTEIRA E MARINHA

AVALIAÇÃO INTEGRADA DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA DO BAIXO RIO DOCE E ÁREA COSTEIRA E MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Beatrice Padovani Ferreira	Pesquisadora	UFPE
Nadson Ressayé Simões	Pesquisador	UFSB
Maikon Di Domenico	Pesquisador	UFPR
Kyssyanne Samihra Santos Oliveira	Pesquisadora	UFES
Posdoc 1 - a contratar	Profissional Júnior	UFPE
Posdoc 2 - a contratar	Profissional Júnior	UFSB
Posdoc 3 - a contratar	Profissional Júnior	UFPR
Posdoc 4 - a contratar	Profissional Júnior	UFES
A contratar	Bolsista de IC	UFPE
A contratar	Bolsista de IC	UFSB
A contratar	Bolsista de IC	UFPR
A contratar	Bolsista de IC	UFES

2. ESCOPO

O sistema em análise abrange a porção dulcícola, estuarina-costeira e marinha, sob impacto ocorrido com o desastre provocado pelo rompimento de barragem de resíduos de minério de ferro em 2015 e subsequente escoamento de material nos afluentes do Rio Doce. O sistema apresenta um gradiente de áreas mais ou menos afetadas e constante re-impacto através de fenômenos climáticos e oceanográficos com diferentes escalas e ciclos. Nos anos subsequentes, diversas pesquisas foram conduzidas, apresentando resultados que indicaram impactos observados a curto, médio e longo prazo nos diversos componentes da biodiversidade e nos serviços ecossistêmicos. Elaborar a síntese e integração destes resultados constitui o objetivo desta proposta.

Em ecologia, a síntese é o ato de combinar dados, teorias, e ferramentas da ecologia e outras disciplinas. A síntese toma a forma de metanálises, revisões, e a integração de modelos teóricos e conceituais, bem como de dados espaciais (por exemplo, mapas) e outros agregados de dados, todos os quais são implementados para examinar teoria fundacional ou problemas de escala relativamente maior ou questões através do tempo ou através do espaço.

O desenvolvimento de metodologias de integração de conceitos, dados e modelos pode fomentar a investigação científica e ajudar a resolver problemas sociais e ambientais. Várias metodologias, plataformas, modelos conceituais analíticos e de infraestrutura eletrônica foram desenvolvidos nas últimas décadas, mas o conceito de integração de dados e de modelos preditivos permanecem um desafio, produzindo em sua grande maioria poucos resultados firmes e reproduzíveis. Embora a integração de dados e modelos seja desafiadora, a aplicação de ferramentas robustas para o estudo da biodiversidade e de métodos para distinguir as respostas da biodiversidade às variações naturais

e/ou antrópicas fortalecem a gestão ambiental, dando suporte científico às soluções de problemas sociais e ambientais, bem como à melhores estratégias de monitoramento.

Avaliar as variações da biodiversidade no tempo e espaço permite: 1) compreender as características que afetam a diversidade de espécies para implementar estratégias eficazes de conservação nos sistemas ecológicos; 2) mitigar a perda de biodiversidade e indicar eventuais medidas reparatórias considerando as possibilidades de estimar a biodiversidade e estabelecer linhas de base antes do impacto; 3) avaliar as respostas ecológicas aos distúrbios naturais e humanos; 4) identificar o impacto agudo e crônico sobre as espécies e as teias alimentares; 5) detectar mudanças na estrutura e função dos ecossistemas; e, 6) identificar ações e áreas prioritárias para a conservação e restauração.

Um avanço importante nesta proposta, é que os monitoramentos tradicionais avaliam a relação dos componentes abióticos dos ecossistemas com grupos taxonômicos específicos de cada compartimento ou ambiente, ou quando avaliam mais de um grupo taxonômico raramente identificam as relações de dependência entre os grupos; e desta forma, perdem informações importantes que são identificadas apenas pela complexa interação existente entre os diversos componentes da biodiversidade e entre seus ecossistemas.

Por outro lado, esse plano de monitoramento multi-grupo da biodiversidade aquática terá como objetivo condutor estudar e analisar a complexidade das interações ecológicas entre os ecossistemas. Esse objetivo deverá ser compatível com as abordagens ecossistêmicas e multidimensionais de nichos ecológicos, constituindo-se em uma eficiente estratégia para entender padrões e processos nos ecossistemas. Além disso, aliado a monitoramentos de longo prazo, o monitoramento multi-grupo pode fornecer informações de tendências ou variabilidade das comunidades que não são detectadas em estudos espaciais. Compreender como as comunidades variam ao longo do tempo pode fornecer subsídios para direcionar políticas de mitigação da perda de espécies e a relação com funções e serviços ecossistêmicos, uma vez que os serviços ecossistêmicos estão intimamente relacionados com a função que as espécies exercem nesses ambientes.

Nesse contexto, o escopo deste projeto contempla a realização da **Modelagem de Ecossistemas Aquáticos** utilizando como ferramenta principal o uso combinado de **Modelos Conceituais e a Análise de Dados Ambientais** primários e secundários. O uso de tais abordagens fornecerá um conhecimento profundo sobre as interações ecológicas observadas na área monitorada, bem como um maior entendimento das alterações ambientais ocasionadas pelos estressores ambientais presentes na área de estudo, sempre atentando às possibilidades de estimativas de biodiversidade anteriores ao impacto através de dados anteriores ao impacto, ou através do uso de controles adequados. Além disso, possibilitará a construção de modelos preditivos mais robustos. Ademais, a elaboração de **Modelos de Ecossistemas** facilita a avaliação da cadeia de impactos monitorados pelo Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, permitindo uma interpretação mais clara dos processos dinâmicos pelo público técnico e não-técnico. A análise integrada teórica, numérica, a síntese de processos e a predição de cenários usará a competência dos diversos pesquisadores e seus subprojetos, considerando seus desenhos amostrais e as matrizes de dados. Assim, a presente proposta realizará uma análise das viabilidades teóricas e analíticas da integração e entendimento das

interações ecológicas, considerando as várias abordagens.

Por fim, destacamos que a análise necessitará da participação dos pesquisadores de todos os subprojetos envolvidos, e seguirá uma sequência organizacional para sintetizar i) Qual a estrutura conceitual e hipóteses levantadas em cada projeto; ii) Quais os padrões e resultados se destacam em cada projeto e podem ser integrados, iii) Quais modelos conceituais de interações ecológicas entre os padrões, iv) Se os padrões são comparáveis e congruentes, v) as escalas temporais e espaciais consideradas. Assim, a análise final desse plano de trabalho terá como produtos uma síntese dos resultados, o desenvolvimento de uma análise integrada conceitual e de dados secundários e primários, e a proposta de avaliação integrada de cenários futuros.

3. OBJETIVO

Considerando os seis objetivos da Proposta técnica do PMBA, o objetivo inicial da estrutura integrativa para o PMBA será de planejamento para a consolidação de estratégias de comunicação e integração entre os projetos já existentes e seus pesquisadores para compreensão dos dados e dos principais resultados, de forma a propor modelos conceituais teóricos que acessem onexo causal, que testem a as respostas integradas transversais aos sistemas ecológicos e que, permitam evoluir de forma participativa em uma síntese dos principais resultados e perspectivas futuras. Desta forma, pretende-se, ao final do exercício:

1. Avaliar os resultados da dinâmica espacial e temporal da biodiversidade aquática, buscando compreender quais os principais processos determinantes.
2. Avaliar de forma integrada e participativa os resultados obtidos e as tendências espaço-temporais dos ecossistemas observados, bem como a possibilidade de identificação da sincronia entre comunidades biológicas, resiliência e estabilidade de comunidades biológicas, e interações entre componentes abióticos e bióticos.
3. Avaliar e prever o comportamento do ecossistema frente a diferentes cenários.
4. Propor formas de integrar o fluxo hidrológico e a dispersão da pluma, bem como sua qualidade, possibilitando a identificação de alterações nos padrões observados, influência na biodiversidade aquática e eficácia de medidas de recuperação.
5. Usar a dinâmica de metacomunidades para definir locais que podem ser fonte de espécies para o *pool* regional de espécies da Bacia Hidrográfica do rio Doce e região marinha e costeira adjacente.
6. Subsidiar as ações de conservação, reparação, restauração e manejo da biodiversidade aquática, no âmbito da região monitorada, através da integração de dados e modelagem ecossistêmica.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Perante o grande volume de dados e análises geradas desde o início do PMBA, a presente proposta busca aplicar uma abordagem de síntese ecológica buscando uma otimização da organização e integração dos resultados multi-grupo e as interações existentes entre os diversos componentes da biodiversidade e os ambientes, bem como seu significado para uma melhor compreensão por parte de gestores e tomadores de decisão. Nessa proposta serão utilizadas abordagens teóricas e numéricas de integração dos diversos componentes dos ecossistemas aquáticos, para elaboração de um Modelo de Ecossistemas, que será construído com as matrizes de dados e os resultados provenientes do monitoramento da região impactada pela presença de rejeito de mineração. Dessa maneira, são propostas seis metas como abordagens integrativas.

META 1 - Modelo espaço-temporal de dispersão do material oriundo da barragem de Fundão dentro da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (porção capixaba) e na região marinha e costeira adjacente.

Construção de modelo conceitual espaço-temporal de dispersão do material oriundo da barragem de Fundão dentro da Bacia do Rio Doce (porção capixaba) e na região marinha e costeira adjacente, fundamentado na integração teórica e numérica dos dados Hidro-Meteoceanográficos e do padrão espaço-temporal dos indicadores da presença do material oriundo da barragem de Fundão.

META 2 - Construção e integração conceitual teórica e numérica dos processos ecossistêmicos observados nas paisagens da Bacia Hidrográfica do Rio Doce e região marinha e costeira adjacente.

Identificar paisagens, relacionar os componentes abióticos e bióticos, e determinar as interações entre processos ecossistêmicos transversais às paisagens da Bacia Hidrográfica do Rio Doce e região marinha e costeira adjacente.

META 3 - Determinação da cadeia de impactos nos ambientes marinho, costeiro e dulcícola com construção de Modelos de Estresse Ambiental

Determinar as cadeias de impactos diretos e indiretos na biodiversidade aquática fundamentado na integração conceitual e numérica (Meta 2), a fim de selecionar os indicadores chaves de impacto.

META 4 - Construção do Modelo de Estresse Ambiental

Identificar as relações causa-efeito a partir de modelos conceituais teóricos elaborados na Meta 2 e da

cadeia de impactos detectados na Meta 3.

META 5 - Análise de sistemas ecológicos dinâmicos, com o uso de modelagem computacional e espacial para avaliar fenômenos e previsão de cenários;

A partir da interpretação dos Modelos de Ecossistemas, avaliar a resposta dos indicadores de impacto a alterações ambientais como secas prolongadas, eventos extremos hidrológicos e eventos extremos meteorológicos.

META 6 - Definição de Áreas prioritárias para Conservação

Identificação de locais que podem servir como fonte de espécies para a manutenção do *pool* regional de espécies da Bacia Hidrográfica e da região marinha e costeira adjacente, bem como definição de estratégias de recuperação de ambientes degradados.

5. PRODUTOS

5.1. PRODUTOS	RESPONSÁVEL
Modelos Conceituais Ecossistêmicos entre os componentes da biodiversidade e as principais forças ambientais nos ambientes dulcícolas, costeiros e marinhos.	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4
Modelos Ecossistêmicos numéricos e relacionais entre os componentes da biodiversidade e as principais forças ambientais nos ambientes dulcícolas, costeiros e marinhos.	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4
Síntese dos Modelos conceituais e relacionais com ênfase nas cadeias de impacto	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4
Simulação de cenários para a variação da biodiversidade nas regiões aquáticas afetadas pelo desastre ambiental de Mariana.	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4
Mapa com a distribuição de locais chaves para manutenção da biodiversidade e de processos ambientais nas regiões dulcícolas, costeiras e marinhas.	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4
Análises da dependência da biodiversidade aos processos ambientais em diferentes regiões (ou seja, identificar as respostas da biodiversidade à dinâmica fluvial e oceanográfica)	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
Pipeline analítico reproduzível com a transformação de dados brutos em respostas integradas	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4
Estratégias de aprimoramento de análises e visualização das respostas integradas	Beatrice Padovani Ferreira, Maikon Di Domenico, Nadson Ressayé Simões, Kyssyanne Samihra Santos Oliveira Pós-doutorandos 1, 2, 3 e 4

6. METODOLOGIA

6.1. META 01

A construção do modelo espaço-temporal de dispersão do material oriundo da barragem de Fundão dentro da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (porção capixaba) e na região marinha e costeira adjacente será desenvolvida em três etapas:

Etapas 1 - Atualização dos processos Hidro-Meteoceanográficos na Bacia Hidrográfica do Rio Doce (porção capixaba) e na região marinha e costeira adjacente a partir dos resultados obtidos ao longo do PMBA;

Etapas 2 – Identificação da variabilidade espaço-temporal conjunta dos indicadores de rejeito/material oriundo do rompimento da barragem de Fundão na área monitorada pelo PMBA a partir de análises estatísticas multivariadas;

Etapas 3 – Com base na discussão integrada dos dados Hidro-Meteoceanográficos, dos resultados de Modelagem Numérica e do padrão espaço-temporal dos indicadores da presença do material oriundo da barragem de Fundão será construído um Modelo Conceitual espaço-temporal de dispersão do material oriundo da barragem de Fundão dentro da Bacia do Rio Doce (porção capixaba) e na região marinha e costeira adjacente.

6.2. META 02

Construção e integração conceitual teórica e numérica dos processos ecossistêmicos observados nas paisagens da Bacia Hidrográfica do Rio Doce e região marinha e costeira adjacente

Etapas 1 - Revisão Bibliográfica de processos ecológicos em ecossistemas aquáticos;

Etapas 2 - Identificação das relações ecológicas presentes na área monitorada;

Etapas 3 - Sintetização e organização de conhecimento científico especializado;

Etapas 4 - Construção dos Modelos Conceituais Ecológicos.

6.3. META 03

Determinação da cadeia de impactos nos ambientes marinho, costeiro e dulcícola com construção de Modelos de Estresse Ambiental

Etapa única:

Análise combinada dos modelos conceituais de ecossistemas e de análises estatísticas de dados ambientais a fim de determinar as cadeias de impactos diretos e indiretos na biodiversidade aquática, através de oficinas. De maneira geral, as análises estatísticas que poderão ser empregadas nesta etapa são:

- Análise de Séries temporais para descrição da variação temporal da biodiversidade;
- Modelos mistos aditivos e/ou generalizados para relacionar as múltiplas séries temporais;
- Relação das séries temporais da biodiversidade com aplicação de análises de sincronia espacial e análises multivariadas;
- Equações estruturais para confirmar os modelos teóricos e empíricos;
- Análise de redes neurais e cálculo de resiliência universal;
- Aprendizado de máquinas como as florestas aleatórias;
- Sistemas ecológicos dinâmicos, baseados no STELLA (Systems Thinking, Experimental Learning Laboratory with Animation) serão utilizados para avaliar quais são as características mais críticas na determinação do comportamento dos ecossistemas.

6.4. META 04

Construção do Modelo de Estresse Ambiental

Etapa 1 - Análises estatísticas para quantificar as respostas dos indicadores bióticos às alterações dos indicadores abióticos;

Etapa 2 - Determinação de níveis de impactos temporais e espaciais;

Etapa 3 - Modelagem empírica dos ecossistemas presentes na área monitorada no âmbito do PMBA (Bacia Hidrográfica do Rio Doce e região marinha e costeira adjacente).

6.5. META 05

Análise de sistemas ecológicos dinâmicos, que usa a modelagem computacional e espacial para avaliar fenômenos e previsão de cenários;

Etapa 1 - Implementação de ferramentas de espacialização;

Etapas 2 - Análises de ferramentas estatísticas de séries temporais para avaliação de tendência como ferramenta de integração de dados;

Etapas 3 - Aplicação de ferramentas estatísticas multivariadas para avaliação de tendências e de integração de dados;

Etapas 4 - Levantamento bibliográfico sobre as principais mudanças climáticas previstas para a área monitorada no âmbito do PMBA;

Etapas 5 - Aplicação de cenários que considerem as flutuações climáticas incluindo projeções relativas a cenários de mudanças climáticas.

6.6. META 06

Definição de áreas prioritárias para conservação

Etapas 1 - Espacialização da distribuição das espécies;

Etapas 2 - Aplicação de modelos de planejamento sistemático de conservação em escala local e regional com análises de complementaridade, insubstituibilidade e lacunas usadas na biologia da conservação;

Etapas 3 - Determinação de Alvos de conservação/recuperação e avaliação de áreas e ações prioritárias através de ferramentas de suporte à decisão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borja, A., Elliott, M., Andersen, J. H., Berg, T., Carstensen, J., Halpern, B. S., Heiskanen, A.-S., Korpinen, S., Lowndes, J. S. S., Martin, G. & Rodriguez-Ezpeleta, N. 2016. Overview of Integrative Assessment of Marine Systems: The Ecosystem Approach in Practice. *Frontiers in Marine Science*, 3. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00020>

Breiman, L. 2001. Random Forests. *Machine Learning*, 45(1), 5–32. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>

Gao, J., Barzel, B., & Barabási, A. L. (2016). Universal resilience patterns in complex networks. *Nature*, 530(7590), 307-312.

Halpern, B. S., Berlow, E., Williams, R., Borer, E. T., Davis, F. W., Dobson, A., ... & Willard, G. (2020). Ecological synthesis and its role in advancing knowledge. *BioScience*, 70(11), 1005-1014.

Park, Y. S., Chon, T. S., Kwak, I. S., & Lek, S. (2004). Hierarchical community classification and assessment of aquatic ecosystems using artificial neural networks. *Science of the total Environment*, 327(1-3), 105-122.

Perkel, j. M. 2019. Workflow systems turn raw data into scientific knowledge. *Nature*, 573(7772), 149–150. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02619-z>

Stupariu, M.-S., Cushman, S. A., Pleşoianu, A.-I., Pătru-Stupariu, I. & Fürst, C. 2021. Machine Learning In Landscape Ecological Analysis: A Review Of Recent Approaches. *Landscape Ecology*. Doi: <https://doi.org/10.1007/S10980-021-01366-9>