

PLANO DE TRABALHO

1 - IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

1.1 – Título do Projeto: Programa de monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I

1.2 – Período de Execução: 16 meses

1.3 – Objetivo Geral:

Executar o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área Ambiental I visando verificar a evolução do impacto do rejeito nos ecossistemas e na biodiversidade associada.

1.3.1 Objetivos Específicos (em consonância com o TR4/ICMBio)

- Analisar dados pretéritos de monitoramento do período novembro 2015 até julho de 2018;
- Monitorar a fauna da foz do Rio Doce e ambientes estuarinos e marinhos impactados;
- Identificar e caracterizar o impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho;
- Avaliar o habitat de fundo marinho, incluindo algas calcáreas, rodolitos e corais, nas áreas estuarinas, marinhas e da foz do rio atingidas pelo material oriundo do “evento”;
- Avaliar a qualidade da água e ecotoxicidade sobre os organismos aquáticos, estuarinos, marinhos e dulcícolas;
- Subsidiar as ações de conservação da biodiversidade no âmbito da região impactada.

1.4– Justificativa do Projeto

O Projeto foi elaborado a partir do Termo de Referência 4, da Cláusula 165 do TTAC, conforme descrito no TR4/ICMBio.

“Em atendimento à **Cláusula 165**, Seção III do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta 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 no âmbito da Ação Civil Pública nº 69758-61.2015.4.01.3400 em trâmite na 12ª Vara Federal da Seção Judiciária de Minas Gerais, nas quais se determina que a Fundação deverá elaborar e implementar medidas para a recuperação e conservação da fauna aquática na ÁREA AMBIENTAL 1, sob orientação do ICMBio, o presente Termo de Referência estabelece as diretrizes e orientações para estabelecimento do Programa de

Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental 1 (alínea “b” item 1) da cláusula 165. Este Programa de Monitoramento também deverá englobar as alíneas “a” do item 1 e “a” e “b” do item 2 as quais deverão compor a primeira fase do programa. A primeira fase consiste na implantação do programa, coleta e análise dos dados no primeiro ano de monitoramento. A partir dessa análise inicial, o programa poderá ser adaptado aos resultados iniciais encontrados. Para fins deste Termo de Referência define-se biodiversidade como a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (segundo o Art. 2 do Decreto Legislativo nº 2, de 1994 que aprova o texto da Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada na cidade do Rio de Janeiro, no período de 5 a 14 de junho de 1992).”

1.5 – Descrição do Plano de Trabalho

A descrição deste Plano de Trabalho segue as diretrizes básicas de apresentação e descrição do Projeto, Resultados Esperados, Mecanismos de Acompanhamento com o Escopo dos Relatórios e Workshops, Equipe Executora, Produtos Esperados, Metas a Serem Atingidas, Cronograma Físico e Operacional. Considerando a complexidade do Programa a ser executado, o detalhamento de cada Projeto e Sub-Projeto, incluindo escopo, metas, resultados esperados, dados a serem gerados e analisados e metodologia está apresentado nos Apêndices I a VIII. O cronograma físico de execução é apresentado para análise geral e detalhada no Apêndice IX. A análise geral apresenta um cronograma físico de execução macro, com os períodos de desenvolvimentos das principais atividades do Programa, bem como os marcos de entrega de produtos, como Relatórios e Workshops. A análise detalhada mostra cronogramas físicos de execução para cada projeto (Anexos do TR4), incluindo os sub-projetos associados, seguindo as etapas, atividades e produtos esperados.

Cronogramas operacionais também são apresentados em separado, por anexo, incluindo uma estimativa do uso de diárias de embarcação (Apêndice X), diárias de veículos, diárias de hospedagem, quantitativo de equipe em trabalho de campo e trabalho de laboratório (Apêndice XI).

2 - DESCRIÇÃO DO PROJETO

O projeto tem como escopo desenvolver o conjunto de atividades referentes ao Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I, referente à cláusula 165 do Termo de Transição de Ajustamento de Conduta – TTAC, de acordo com o Termo de Referência 4 (TR 4) a ela vinculado, no qual são estabelecidas as diretrizes e orientações para o cumprimento do citado programa (doravante designado por Programa de Monitoramento).

Ressalte-se que o presente projeto é composto por duas grandes partes, que são executadas concomitantemente: (i) Atividades-suporte ao Programa de Monitoramento para ambientes estuarino, marinho e dulcícola; (ii) Programa de Monitoramento para ambientes estuarinos, marinhos e dulcícola, conforme discriminado abaixo.

Etapa 1: Atividades-Suporte ao Programa de Monitoramento para Ambientes Estuarinos, Marinhos e Dulcícolas

Atividade 1.1. Avaliação e consolidação de dados pretéritos:

A avaliação dos dados secundários visa atender as Alíneas a e b do item 2 da Cláusula 165, objeto do TR4, que para o seu desenvolvimento irá demandar a realização de revisão bibliográfica. Os dados pretéritos a serem avaliados são Relatórios produzidos para a Samarco e Fundação Renova, bem como dados disponíveis na literatura, e abrangem vários temas relacionados aos ecossistemas aquáticos da bacia hidrográfica do Rio Doce. Estas análises seguirão as seguintes etapas: Avaliação da Base de Dados Pretéritos para validar a consistência dos dados; Análise Crítica dos Dados Brutos e Verificação Estatística para avaliar a significância dos dados; Consolidação da Base de Dados Disponível, incluindo bibliografia técnico/científica e dados não pertencentes a Samarco e Fundação Renova, objetivando a construção de um diagnóstico ambiental do que for possível.

O objetivo principal da análise dos dados pretéritos é a identificação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos sobre as espécies biológicas e cadeia trófica dos ecossistemas dulcícolas, estuarino e marinho; além da avaliação do habitat de fundo marinho, incluindo algas calcáreas, rodólitos e corais, nas áreas estuarinas, marinhas e da foz do rio atingidas pelo material oriundo do desastre ambiental.

Atividade 1.2. Vistoria técnica da área de estudo

A vistoria técnica em campo visa, especialmente:

- Realizar o reconhecimento da área a ser estudada;
- Validar pontos e estações amostrais;
- Avaliar a logística de campo;
- Obter subsídios para o estabelecimento de protocolos de monitoramento em campo.

Atividade 1.3. Elaboração de protocolos de monitoramento em campo e de análises laboratoriais

A elaboração de protocolos de monitoramento em campo e de análises laboratoriais é fundamental para assegurar a qualidade das amostras e dos dados gerados pelos processos analíticos a serem aplicados.

Os protocolos serão desenvolvidos por membros das equipes de pesquisadores envolvidas na execução do Programa de Monitoramento. Serão, entre outros, descritos os procedimentos de manuseio, coleta, armazenamento e distribuição das amostras coletadas, bem como dos procedimentos analíticos em laboratório e tabulação e análise de dados.

Atividade 1.4. Preparação do Plano de Gestão de Dados

A elaboração do Plano de Gestão de Dados seguirá as orientações do TR 4/ICMBio para o armazenamento dos dados brutos e sua disponibilização em bancos de dados abertos ao CIF, ICMBio, IBAMA e às Secretarias Estaduais de Meio Ambiente dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Dar-se-á em conjunto com a Fundação Renova.

No Plano:

- Será estabelecida uma metodologia para que os dados sejam mantidos com segurança, e estejam disponíveis para as gerações de tomadores de decisão e pesquisadores ao longo do tempo;
- Serão detalhados os mecanismos de gestão de dados, com especificações sobre:
 - Repositórios para armazenamento dos dados;
 - Metadados para descrição dos dados;
 - Banco de Dados dirigido às questões/temáticas cobertas pelo TR 4;
 - Formas de visualização dos dados;
 - Infraestrutura física e humana necessária para a implementação do Plano de Gestão.

Etapa 2: Programa de Monitoramento para Ambientes Dulcícola, Estuarino e Marinho

O Programa de Monitoramento para ambientes dulcícola, estuarino e marinho compreende projetos específicos, conforme o tipo de estudo, ambiente ou grupo de organismos abrangido pelos 07 anexos do TR 4 do Programa de Monitoramento aqui considerados. Cada Anexo está sendo descrito aqui como um componente do Programa, devidamente relacionada aos Anexos do TR4. O Anexo 2 será realizado parcialmente, considerando as análises genéticas nos peixes e os estudos de macrófitas aquáticas, fitoplâncton, zooplâncton e perifíton. Para este Programa, os Projetos (listados abaixo) que estarão sendo executados, seguem os Anexos definidos no TR4 (**escopo, metas, metodologia, resultados esperados de cada projeto e sub-projeto, por Anexo, são apresentados nos Apêndices I a VIII**). A Figura 1 mostra um panorama de distribuição de todas as estações que serão monitoradas ao longo dos 12 meses de execução deste programa, incluindo todos os Anexos do TR4:

**PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE
AQUÁTICA DA ÁREA AMBIENTAL I**

- Anexo 1: Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da Barragem de Mariana (MG) em regiões estuarinas, marinhas e dulcícola.
Coordenação: Prof. Adalto Bianchini
- Anexo 3/2: Estudo e monitoramento ambiental da área dulcícola, estuarina e marinha.
Coordenação: Professores Fabian Sá e Gilberto Barroso
- Anexo 4: Monitoramento de potenciais impactos do rejeito de minério de ferro na praia e antepraia adjacentes da desembocadura do Rio Doce.
Coordenação: Professoras Jacqueline Albino e Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima
- Anexo 5: Alterações ecológicas na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce
Coordenação: Professores Diolina Moura e Mônica Tognella
- Anexo 6: Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio doce, plataforma continental e áreas protegidas adjacentes.
Coordenação: Professor Agnaldo Martins e Ana Paula Cazerta
- Não faz parte deste Anexo o Programa de Monitoramento de Praias, entretanto, para a execução do Plano de Trabalho é fundamental a interação com os executores do PMP. Para isso se faz necessário que a Fundação Renova tenha um acordo formal com os executores e informe a FEST/RRDM quais são as responsabilidades acordadas com os executores para evitar problemas de execução e cumprimento do TR4.
- Anexo 7/2: Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha, estuarina e dulcícola
Coordenação: Professores Jorge Dergam e Maurício Hostim
- Anexo 8: Monitoramento da sedimentação no parque nacional marinho dos abrolhos e regiões relacionadas
Coordenação: Professor Heitor Evangelista

PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA DA ÁREA AMBIENTAL I

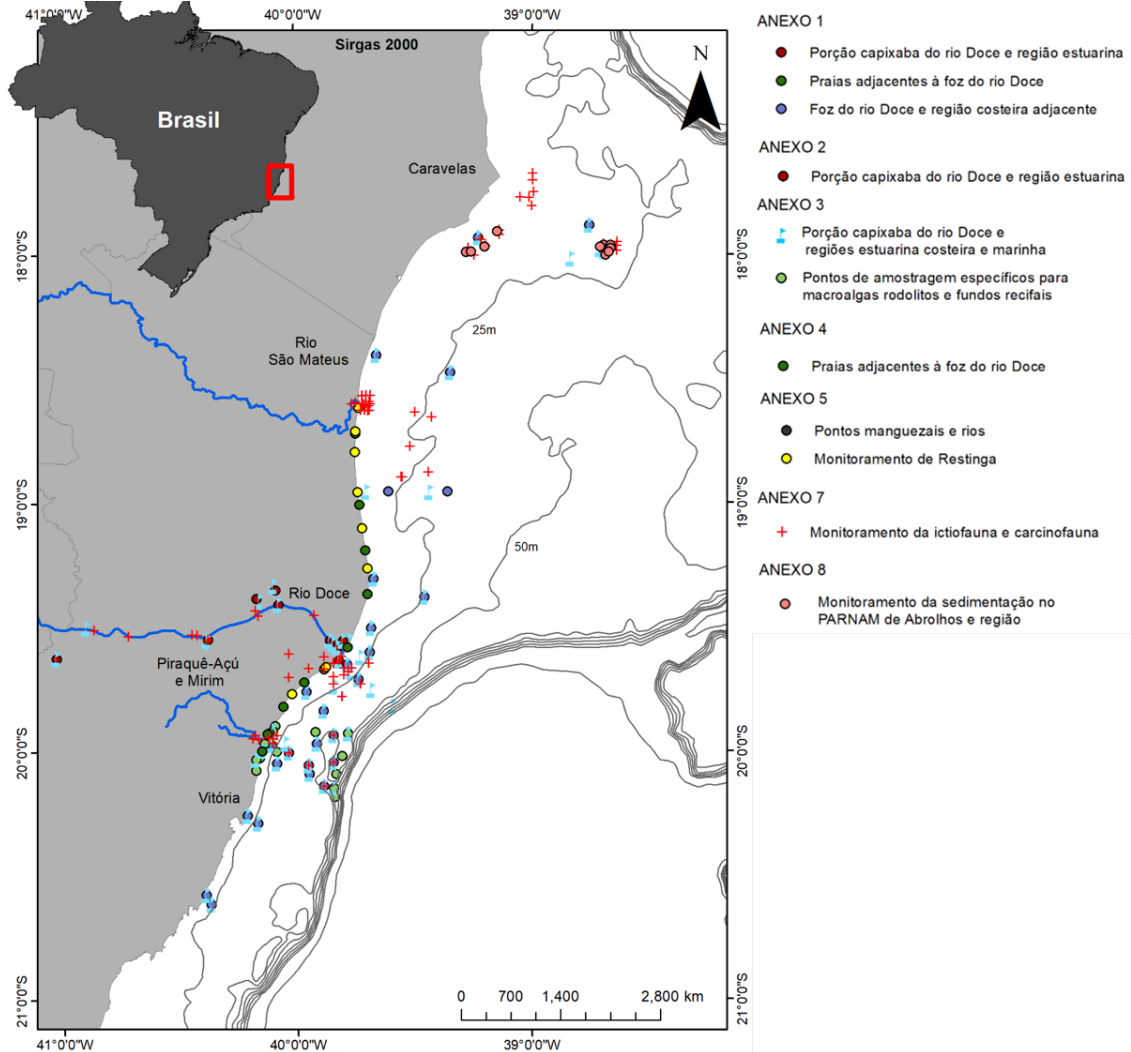


Figura 1: Mapa com a distribuição de todos os pontos referentes as estações de monitoramento do TR4. Vale destacar que os quatro pontos de fundeio não estão inseridos neste mapa porque serão definidos com base nas análises dos 2 primeiros meses de execução desta proposta, considerando dados já coletados. Os polígonos referentes ao mapeamento e monitoramento de habitats também não estão neste mapa considerando que as áreas específicas serão definidas com base nos dados pretéritos. A localização das estações e parcelas nos Manguezais, Restingas e Praias é apenas indicativa da área de estudo. As coordenadas das parcelas no manguezal e restinga, bem como das estações de coleta nas praias serão determinadas na primeira ida a campo. Além disso, não existem coordenadas específicas para pontos de coleta no Anexo 6, existe apenas a referência de áreas a serem estudadas que estão inseridas na Área Ambiental I. A planilha Excel com todas as coordenadas plotadas neste mapa está encaminhada como o Apêndice XII.

3 – RESULTADOS GERAIS ESPERADOS

Dentre os resultados esperados, destacam-se os seguintes:

- Definição de bioindicadores da qualidade do ecossistema e do impacto do desastre;
- Entendimento dos impactos agudos e crônicos do desastre nos diferentes ecossistemas, a partir de uma análise integrada usando dados de antes do desastre, quando existirem;
- Entendimento do impacto do desastre na estrutura de flora e fauna nos ambientes estudados, usando dados pretéritos;
- Mapeamento dos habitats marinhos e avaliação temporal dos impactos no mesmo;
- Compreensão do impacto do rejeito na biodiversidade marinha, estuarina e dulcícola;
- Simulação do efeito da pluma de rejeitos no comportamento biogeoquímico e avaliação de sua influência na biodiversidade;
- Diagnóstico do comprometimento da estrutura e função dos ecossistemas aquáticos decorrente do “evento”;
- Proposição de metas a serem alcançadas para melhorar a qualidade dos ecossistemas;
- Proposição de ações de mitigação do impacto ambiental e visando melhor manejo para conservação da biodiversidade.

Detalhamento dos resultados esperados encontram-se disponíveis nos apêndices correspondente a cada anexo e nos cronogramas executivos.

4 – MECANISMOS DE ACOMPANHAMENTO DE EXECUÇÃO

- **Reuniões mensais/bimestrais/trimestrais de acompanhamento e alinhamento das atividades com a área técnica das ICT’s, FEST e da Fundação Renova:** Reuniões de acompanhamento e alinhamento de aspectos técnicos e administrativos/burocráticos para garantia do bom andamento do projeto. Estas reuniões serão realizadas de acordo com demandas do Comitê Gestor;
- **Relatórios de Acompanhamento Físico e Financeiro (curva S de tempo e custo):** Estes relatórios seguem o modelo de gestão de projeto conforme previsto;

- **Prestações de contas mensais e final das transações financeiras realizadas durante o período de vigência:** Relatórios com todas as prestações de contas, e gastos executados em períodos conforme previsto;
- **Entrega de relatório de análise de dados pretéritos:** Este relatório tem como escopo apresentar uma avaliação da base de dados pretéritos para validar a consistência dos dados apresentados em relatórios disponíveis, seguida de uma análise crítica dos dados, e consolidação da base de dados disponível para ser usada como instrumento de comparação com o monitoramento a ser executado em 12 meses. O modelo de apresentação estará sendo definindo na etapa de protocolo;
- **Entrega de relatório sobre Plano de Gestão de Dados:** O plano de gestão de dados irá discutir mecanismos de gestão de dados com os pesquisadores que irão executar este Programa, a Fundação Renova e os técnicos e analistas da CTBio, visando apresentar propostas sobre repositórios para armazenamento dos dados, formato de metadados para descrição dos dados, banco de dados dirigido às questões/temáticas cobertas pelo TR 4, formatos de visualização dos dados e infraestrutura física e humana necessária para a implementação do Plano de Gestão;
- **Entrega de relatórios trimestrais:** Relatórios descritivos das atividades desenvolvidas no período, incluindo atividades de campo, processamento de amostras e tabulação de dados. Todos estes relatórios serão entregues para cada um dos 07 Anexo do TR4 considerados no presente Programa de Monitoramento. A estrutura do relatório será discutida na etapa de protocolo, mas deve seguir o formato com objetivo, etapas executadas, metodologia e planilha de dados;
- **Relatório semestral técnico integrado com análise de dados:** Os relatórios semestrais serão entregues com a análise dos dados coletados e processados, por anexo. O formato deve seguir a estrutura com introdução, objetivo, metodologia/base de dados, resultados e análise de dados, avaliação preliminar e final. Um relatório consolidado com uma análise

integrada, considerando a base de dados pretérita será entregue como produto dos relatórios semestrais;

- **Workshops envolvendo equipes técnicas e coordenações técnicas das ICT's, Fundação Renova e gestoras/gerenciadoras da execução:** Os workshops terão apresentações do escopo, objetivos, metodologia, resultados e análises parciais e finais de cada anexo. Cada anexo fará uma apresentação já englobando análises integradas, sendo que uma análise final de consolidação também será apresentada. Uma vez feitas as apresentações, haverá grupos de discussão para estabelecimento de novas metas, escopos e sugestões para tomadas de decisão, quando couber. A metodologia dos workshops ainda será debatida durante os primeiros dois meses de mobilização de equipes e entregue a Renova e a CTBio para apreciação e aprovação.

5 – EQUIPE EXECUTORA

Apresenta-se no Quadro 1 a Equipe Executora Principal, composta pelos coordenadores gerais e de projetos.

Quadro 1 – Equipe Executora Principal

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização	ICT's	Anexo
1	Adalto Bianchini	Doutor II - Coordenador Geral	Ecotoxicologia e análises de contaminantes orgânicos e biomarcadores em amostras biológicas e metais em amostras ambientais (água, sedimento e biota)	FURG	1
2	Agnaldo Silva Martins	Doutor II - Coordenador de Projeto	Coordenador sub-proposta / relações com habitat com drones	UFES	6
3	Alessandra Delazari Barroso	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de fitoplâncton dulcícola	FAESA	3/2
4	Alex Cardoso Bastos	Doutor II - Coordenação Geral	Mapeamento de habitats	UFES	3

**PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE
AQUÁTICA DA ÁREA AMBIENTAL I**

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização	ICT's	Anexo
5	Ana Cristina Teixeira Bonecker	Doutor II - Coordenador Projeto	Ictioplâncton	UFRJ	3
6	Ana Paula Cazerta Farro	Doutor II - Coordenador de Projeto	Realizar as análises laboratoriais de cetáceos; e subprojetos de Genética e Uso do habitat por ponto fixo e embarcado.	UFES	6
7	Anderson Geyson Alves de Araújo	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de macrófitas aquáticas	UFES	3/2
8	Björn Gücker	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ciclagem de matéria e fluxo de energia	UFSJ	3
9	Camilo Dias Junior	Doutor II - Coordenador Projeto	Fitoplancton	UFES	3
10	Diolina Moura Silva	Doutor II - Coordenador de Projeto	Responsável pela coordenação de monitoramento do restinga	UFES	5
11	Edmilson Costa Teixeira	Doutor II - Coordenação Geral	Análise integrada de dados/resultados e atuação em rede	UFES	Todos
12	Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de zooplâncton dulcícola	UFOP	3/2
13	Eustáquio Vinícios Ribeiro de Castro	Doutor II - Coordenação Geral	Gestão de projetos no contexto de programa de monitoramento integrado: ecossistemas – biodiversidade aquáticos	UFES	Todos
14	Gilberto Barroso	Doutor II - Coordenação Geral Anexo	Análise de aporte de nutrientes e poluentes	UFES	3/2
15	Gilberto Menezes Amado Filho	Doutor II - Coordenador Projeto	Fundos Recifais - Responsável pelo componente algas/rodolitos/CAUs	JBRJ	3
16	Heitor Evangelista	Doutor II - Coordenador de Projeto	Sedimentologia Marinha	UERJ	8
17	Iola Gonçalves Boechat	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	mixotrofia e ecofisiologia de organismos	UFSJ	3/2
18	Jacqueline Albino	Doutor II - Coordenador de Anexo	Responsável pelo componentes plancton, água e zooxantelas	UFES	4
19	Jean-Christophe Joyeux	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Coordenador de Sub-projeto - rede trófica	UFES	7

**PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE
AQUÁTICA DA ÁREA AMBIENTAL I**

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização	ICT's	Anexo
20	Jorge Dergam	Doutor II - Coordenador Projeto	Genética de Peixes	UFV	2 e 7
21	Karla Gonçalves da Costa	Doutor II - Coordenador Projeto	Coordenar as atividades relativas as análises da fauna bentônica	UFES	4
22	Leandro Bugoni	Doutor II - Coordenador de Projeto	Coordenador do sub-projeto de estudo do impacto sobre as aves marinhas.	FURG	6
23	Leila Longo	Doutor II - Coordenador Temático Bentos	Bentos	UFRB	3
24	Luiz Fernando Loureiro Fernandes	Doutor II - Coordenador Projeto	Zooplâncton	UFES	3
25	Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima	Doutor II - Coordenador Projeto	Coordenar as atividades relativas as análises geoquímicas dos sedimentos	UFES	4
26	Maurício Hostim- Silva	Doutor II - Coordenador de Projeto	coordenar o projeto de ictiofauna estuarina/marinha	UFES	7
27	Mônica Maria Pereira Tognella	Doutor II - Coordenador de Projeto	Responsável pela coordenação de monitoramento do manguezal	UFES	5
28	Renato Ghisolfi	Doutor II - Coordenador Projeto	Modelagem	UFES	3
29	Renato Rodrigues Neto	Doutor II - Coordenador Projeto	Análises Hidrogeoquímica	UFES	3
30	Rodrigo Leão de Moura	Doutor II - Coordenador Projeto	Responsável pelos componentes recifes, sedimento e SIG	UFRJ	3
31	Sarah Maria Vargas	Doutor II - Coordenador de Projeto	Tartarugas Marinhas	UFES	6
32	Valéria da Silva Quaresma	Doutor II - Coordenador Projeto	Sedimentologia	UFES	3
33	Valéria de Oliveira Fernandes	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia do perifíton	UFES	3/2

6 – PRODUTOS ESPERADOS

- **1- Atividades-Suporte ao Programa de Monitoramento para Ambientes Estuarinos, Marinhos e Dulcícolas:**
 - Dados pretéritos avaliados e consolidados
 - Vistoria à área de estudo realizada, incluindo validação de pontos amostrais e estações de monitoramento
 - Protocolos de monitoramento e de análises laboratoriais
 - Plano de Gestão de Dados

- **2- Programa de Monitoramento para Ambientes Dulcícola, Estuarino e Marinho:**
 - Dados brutos armazenados em repositórios e disponibilização em bancos de dados abertos
 - Relatórios de Dados
 - Relatórios Técnicos
 - Avaliação Parcial do Programa de Monitoramento
 - Difusão do Conhecimento

7 – CRONOGRAMAS DE EXECUÇÃO FÍSICA E OPERACIONAL

Os cronogramas de execução física e operacional são apresentados em planilha Excel nos Apêndice IX, X e XI. Os arquivos consistem de abas apresentando as atividades de cada anexo, bem como as atividades de caráter geral.

8 – EXPERTISE COMPROVADA NA TEMÁTICA DO PROJETO, FORTALECIMENTO DE BASE TÉCNICO-CIENTÍFICA PARA ATUAÇÃO FUTURA, CREDIBILIDADE E TRANSPARÊNCIA

- **Expertise comprovada quanto ao desenvolvimento de estudos, geração e difusão de conhecimento, bem como formação de recursos humanos nos temas relacionados aos respectivos componentes específicos e histórico de Programas e Projetos de pesquisa já realizados na região**
 - A Equipe Técnica responsável pela execução do Plano de Trabalho possui competência nas diversas temáticas relacionadas ao Programa de Monitoramento e experiência em termos de atuação profissional na Área Ambiental I. Vários coordenadores de projeto e seus grupos de pesquisa associados possuem estudos em desenvolvimento e publicações sobre o sistema continental e marinho, a biodiversidade associada e dados pretéritos relacionados aos impactos do rompimento da barragem de Fundão da Samarco, que servirão de base para análises referentes aos impactos

PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA DA ÁREA AMBIENTAL I

agudos e crônicos deste evento na biodiversidade aquática da Área Ambiental I. Por um lado, a referida expertise presente na Equipe Técnica responsável pela execução do Plano de Trabalho proporcionará qualidade e credibilidade aos produtos esperados acima relacionados e ao processo de desenvolvimento dos mesmos; por outro lado, o Programa de Monitoramento proporcionará a esses grupos de pesquisa, entre outros: oportunidade de aplicação na prática de conhecimentos por eles produzidos; e visibilidade junto a órgãos gestores ambientais e à sociedade como um todo.

- **Criação de expertise e estruturação local para responder ao evento atual a longo prazo e a eventos semelhantes no futuro**
 - O rompimento da barragem de Fundão / Samarco resultou em impactos ambientais sem precedentes no Brasil, cujos processos de recuperação e mitigação requerem criação de competências, seja pela dimensão e diversidade do impacto seja pelo caráter inter e transdisciplinar das alternativas de solução para esses processos, entre outros. Esse um aspecto de grande diferencial do presente Projeto, que foca tanto na execução do Programa de Monitoramento, propriamente dito, como na criação de expertise para responder ao evento atual a longo prazo e a eventos semelhantes no futuro. 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 Renova e de órgãos gestores ambientais).
 - Em termos de estruturação local para responder ao evento atual a longo prazo e a possíveis e indesejáveis eventos de natureza semelhantes no futuro, a execução do Projeto contribuirá muito nesse sentido. Alguns exemplos disso são dados a seguir:
 - Em função da demanda de trabalho, algumas instituições e grupos de pesquisa envolvidos na execução do Projeto estão tendo 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 Programa de Monitoramento;
 - Da mesma forma, uma série de equipamentos estão sendo adquiridos com a finalidade de viabilizar: as análises laboratoriais dos dados levantados em campo; o levantamento de dados em campo; o armazenamento de dados e informações em repositórios; e para processamento e análise de dados propriamente ditos.
 - Por fim, parte da Equipe Técnica envolvida com a execução do Projeto é composta de professores, graduandos e pós-doutorandos. Ou seja, tem-se aqui a execução do Programa de Monitoramento contribuindo para a formação e aperfeiçoamento de pessoal.
- **Credibilidade e transparência dos dados para a sociedade**
 - Como já comentado acima, a Equipe Técnica responsável pela execução do Projeto é constituída essencialmente por membros de instituições acadêmicas e/ou de pesquisa formadoras da RRDM ou a elas vinculados,

que têm na sua independência e expertise a credibilidade necessária para executar os estudos de monitoramento e avaliações previstos no Programa de Monitoramento. No que diz respeito à credibilidade e transparência de dados para a sociedade, 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 Renova ofereça aos órgãos gestores ambientais e à sociedade transparência e acesso aos dados levantados e gerados e a informações produzidas; neste caso, em linguagem acessível a públicos diversos, especialmente ao público geral.

9 – ESTRUTURA ORGANIZACIONAL E GERENCIAL PARA EXECUÇÃO DO PROGRAMA

Como apresentado nas seções anteriores, o Programa de Monitoramento é de grande complexidade de execução por envolver uma grande diversidade de temas e especializações na área da biodiversidade aquática, cobrir extensas áreas de ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos, bem como pelo caráter do evento, sem precedentes. Conseqüentemente, não será diferente a execução da Programa, que, entre outros, demandará de estrutura organizacional e gerencial em suporte ao desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Nesse sentido, o Programa contará com uma Coordenação de Gerenciamento de Projetos e Atuação em Rede (COGER), que oferecerá às equipes de pesquisa de ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos serviços de gerenciamento de projetos, de dispositivos voltados para uma atuação integrada, de gestão de dados, e de comunicação corporativa. Uma das principais razões de sua criação foi propiciar aos pesquisadores foco no desenvolvimento de atividades-fim (técnicas e técnico-científicas).

A COGER é subdividida em Escritório de Projetos (EscPro) e Núcleo de Atuação Integrada em Rede (NAIR).

O NAIR têm como objetivos:

- Aplicar e/ou desenvolver dispositivos e estratégias voltadas para a atuação integrada em rede no âmbito do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática;
- Pesquisar no tema e gerenciar a base de dados constituída/estruturada no âmbito do Programa;
- Pesquisar, preparar e aplicar estratégias de comunicação corporativa integrada visando contribuir para a potencialização de desempenho do Programa como um todo.

O detalhamento das atividades do NAIR encontram-se disponíveis no Cronograma de Execução Física (Apêndice IX).

O EscPro tem como principal objetivo o gerenciamento organizacional dos projetos vinculados ao Programa, baseado em uma estratégia corporativa e utilizando-se de metodologia de gerenciamento de Projetos, Programas e Portfólios, bem como na utilização de outros métodos organizacionais que possibilitem uma execução consistente e previsível.

No sentido de possibilitar que a gestão baseada em Portfólio de Projetos possa traduzir a visão e razão de ser do Programa, em conjunto com medidas de desempenho, o modelo de gestão será operacionalizado por meio da utilização da ferramenta BSC (“Balanced Scorecard”).

O Gerenciamento de Projetos atenderá às práticas de gestão estipuladas pelo Guia PMBOK®, através das dez áreas de conhecimento, a saber:

- Gerenciamento de Integração do Projeto.
- Gerenciamento de Escopo do Projeto.
- Gerenciamento do Tempo do Projeto.
- Gerenciamento dos Custos do Projeto.
- Gerenciamento da Qualidade do Projeto.
- Gerenciamento dos Recursos Humanos do Projeto.
- Gerenciamento da Comunicação do Projeto.
- Gerenciamento dos Riscos do Projeto.
- Gerenciamento das Aquisições do Projeto.
- Gerenciamento das Partes Interessadas do Projeto.

Adicionalmente, em face das peculiaridades do objeto dos projetos em referência, propõe-se à inclusão de três frentes de gerenciamento:

- Gerenciamento de Campo.
- Gerenciamento de Logística.
- Gerenciamento de Saúde, Segurança e Meio Ambiente.

**MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO DOS IMPACTOS CAUSADOS PELA
LAMA ORIUNDA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE MARIANA (MG) EM
REGIÕES DULCÍCOLAS, ESTUARINAS E MARINHAS (ANEXO 1)**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Adalto Bianchini	Coordenador	FURG
Aloísio José Bueno Cotta	Membro da Equipe	UFES
Camila de Martinez Gaspar Martins	Membro da Equipe	FURG
Flávia Lima do Carmo	Membro da Equipe	UFRJ
Juliana Castro Monteiro Pirovani	Membro da Equipe	UFES
Juliana Zomer Sandrini	Membro da Equipe	FURG
Marta Marques de Souza	Membro da Equipe	FURG
Maysa do Vale Oliveira	Membro da Equipe	UFES
Paola Rocha Gonçalves	Membro da Equipe	UFES
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	FURG
Pós-doutor	Membro de Equipe	UFES
Pós-doutor	Membro de Equipe	UFRJ
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	FURG
Iniciação científica	Membro de Equipe	UFRJ
Profissional Mestre I	Membro de Equipe	FURG
Profissional Mestre I	Membro de Equipe	UFES
Profissional Júnior	Membro de Equipe	FURG
Profissional Júnior	Membro de Equipe	FURG
Profissional Júnior	Membro de Equipe	FURG
Profissional Júnior	Membro de Equipe	FURG
Profissional Júnior	Membro de Equipe	FURG
Profissional Júnior	Membro de Equipe	UFES
Técnico nível médio	Membro de Equipe	UFES

2. ESCOPO

Este documento visa detalhar o monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pelo desastre ocorrido em Mariana (MG), com graves consequências para os ecossistemas dulcícolas, estuarinos e costeiros. O monitoramento ecotoxicológico será semestral englobando diferentes níveis da cadeia trófica, incluindo a microbiota, os recursos pesqueiros (peixes e crustáceos), a avifauna, a herpetofauna e a mastofauna aquática. Conforme definido no Anexo 1 do TR4 e, posteriormente, na Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBi, amostras de água e sedimento serão coletadas em **10 pontos de amostragem no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário**. Com relação aos pontos amostrais na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, salientamos que existe uma incompatibilidade entre o número de pontos amostrais indicados ao longo do Anexo 1 para as

diferentes coletas a serem realizadas. No item "Áreas de estudo" do Anexo 1 do TR4, existe a menção de que na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, um primeiro conjunto de estações de amostragem deverá contemplar 30 pontos de coleta de amostras, citando a Figura 2 e a Tabela 1 do referido Anexo: Região de Abrolhos (3 pontos de amostragem), Itaúnas – Conceição da Barra/ES (2 pontos de amostragem), Barra Nova - São Mateus/ES (2 pontos de amostragem), Degredo – Linhares/ES (2 pontos de amostragem), Foz do Rio Doce – Linhares/ES (6 pontos de amostragem), APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz – Aracruz/ES (11 pontos de amostragem), Vitória/ES (2 pontos de amostragem) e APA de Setiba - Guarapari/ES (2 pontos de amostragem). No entanto, a Tabela 1 do Anexo 1 do TR4 fornece as coordenadas geográficas para apenas 28 pontos de amostragem, sendo apenas 9 pontos de amostragem (e não 11 pontos de amostragem) na APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz – Aracruz/ES. Por sua vez, a definição do número de pontos amostrais a serem utilizados para as coletas de água, sedimento e biota, fica bem clara e evidente na descrição do item 3 "Metodologia e Periodicidade" do Anexo 1 do TR 4. Neste caso, o item 3.1. "Amostras de água" do Anexo 1 do TR 4 cita a mesma Figura (Figura 2) e Tabela (Tabela 1) do referido Anexo, deixando explícito que as amostras de água deverão ser coletadas em **21 pontos de amostragem na foz do Rio Doce e região costeira adjacente**. Da mesma forma, o item 3.2. "Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água da Foz do Rio Doce e região costeira" do Anexo 1 do TR4 estabelece que os testes ecotoxicológicos serão realizados com as amostras de água e sedimento coletadas nos mesmos 21 pontos de amostragem mencionados no item 3.1. "Amostras de água" do referido Anexo. Portanto, salienta-se a necessidade de unificar o número de pontos amostrais para as coletas de água (item 3.1 do Anexo 1 do TR4), testes toxicológicos com água e sedimento (item 3.2. do Anexo 1 do TR4), análises na biota (item 3.3. do Anexo 1 do TR4), análises da microbiota na água e no sedimento (item 3.4. do Anexo 1 do TR4) e análises químicas no sedimento (item 3.7. do Anexo 1 do TR4), visando a adequada execução do monitoramento ecotoxicológico pretendido, bem como a adequada interpretação dos dados a serem obtidos e a integração dos mesmos com aqueles já obtidos durante as 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Cabe ressaltar que estas expedições anteriores promovidas pelo ICMBio contemplaram 21 pontos de amostragem, dentre aqueles 28 pontos de amostragem elencados na Tabela 1 do Anexo 1 do TR4. Portanto, no âmbito do presente Plano de Trabalho, o conjunto de estações de amostragem contemplará apenas os mesmos **21 pontos de amostragem** (Tabela 1 do presente documento) que já vêm sendo monitorados no âmbito das expedições do ICMBio, dentre aqueles indicados para a área de abrangência apresentada no Anexo 1 do TR4, a saber: Região de Abrolhos (3 pontos de amostragem), Itaúnas – Conceição da Barra/ES (2 pontos de amostragem), Barra Nova - São Mateus/ES (2 pontos de amostragem), Degredo – Linhares/ES (2 pontos de amostragem), Foz do Rio Doce – Linhares/ES (6 pontos de amostragem), APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz – Aracruz/ES (2 pontos de amostragem), Vitória/ES (2 pontos de amostragem) e APA de Setiba - Guarapari/ES (2 pontos de amostragem). Por fim, cabe destacar que a adoção destes 21 pontos de amostragem para o programa de monitoramento em questão também se justifica com base na ausência de diferenças significativas entre os resultados obtidos para as diferentes áreas da foz do Rio Doce e região costeira adjacente, observada especialmente nas últimas expedições de monitoramento e pesquisa promovidas pelo ICMBio em 2017 e 2018. Portanto, do ponto de vista técnico e científico, não se justifica atualmente a avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais e biológicas oriundas de uma área restrita (APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz – Aracruz/ES) com uma alta densidade de pontos de amostragem (11 pontos de amostragem; 36,7% do total de pontos amostrais), especialmente considerando-se a enorme extensão de toda área a ser monitorada (Figura 2 do Anexo 1 do TR4). As amostras coletadas nos 21 pontos de amostragem da foz do Rio Doce e região costeira adjacente serão analisadas quanto à contaminação por metais e o potencial de toxicidade para a biota. Análises de parâmetros físico-químicos da água também serão realizadas nos 31 pontos amostrais (10 pontos de amostragem no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário e 21 pontos de amostragem na foz do Rio Doce e região costeira adjacente). Amostragens de água e sedimento para avaliação da composição da microbiota serão realizadas em 10 pontos de amostragem no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, bem como em 21 pontos amostrais na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Amostras de corais para avaliação da composição da microbiota serão realizadas em 3 pontos de coleta no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e em recifes-controle fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos. Amostragens de plâncton, invertebrados e peixes para avaliação da acumulação de metais e respostas de biomarcadores serão realizadas em 10 pontos de amostragem no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, bem como em 21 pontos de amostragem na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Amostragens de invertebrados para avaliação da

acumulação de metais e respostas de biomarcadores também serão realizadas em 10 pontos de amostragem no ambiente praiado e em 6 pontos de amostragem nos manguezais. Amostragens de aves para avaliação da acumulação de metais serão realizadas em 5 áreas: estuarina, manguezais, costeira e marinha (a bordo e em Abrolhos). As coletas de amostras de aves no estuário, manguezais e região costeira estão descritas no presente Anexo. Por sua vez, as coletas de amostras de aves marinhas (a bordo e em Abrolhos) são aquelas descritas no Anexo 6 do TR4. As amostragens de quelônios e cetáceos para a avaliação dos níveis de contaminantes (metais, organoclorados, organobromados e HPAs) serão realizadas em indivíduos encontrados nas praias do litoral norte capixaba. As coletas dessas amostras são aquelas descritas no Anexo 6 do TR4. Todas as análises das amostras de cetáceos serão realizadas no âmbito do Anexo 6 do TR4.

3. OBJETIVOS

O monitoramento ecotoxicológico descrito no presente documento tem como objetivos:

- (a) investigação dos efeitos causados pela exposição crônica e aguda ao sedimento e à água de regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas, através de testes de toxicidade em laboratório utilizando organismos dulcícolas, estuarinos e marinhos como bioindicadores;
- (b) avaliação das concentrações de metais na água, no sedimento e em organismos dulcícolas, estuarinos e marinhos de diferentes níveis da cadeia trófica, incluindo os produtores primários (fitoplâncton) e secundários (zooplâncton), os recursos pesqueiros (peixes e crustáceos) das regiões dulcícola, estuarina e marinha, bem como a avifauna, herpetofauna e mastofauna estuarina e marinha;
- (c) análise de biomarcadores de exposição e efeito de metais em organismos dulcícolas, estuarinos e marinhos de diferentes níveis da cadeia trófica;
- (d) avaliação da microbiota e detecção de bioindicadores de impactos ambientais no sedimento e na água na Área Ambiental 1 e na região costeira adjacente à foz do Rio Doce, bem como em corais de recifes próximos ao sul do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, e em recifes-controlados fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Os resultados obtidos nas análises pretéritas realizadas no âmbito das 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente demonstram a existência de toxicidade crônica bem acentuada, assim como a contaminação por metais na água coletada nas diferentes áreas de estudo, sendo que em muitos casos os níveis observados representam concentrações acima dos limites permitidos para as águas de Classe I, conforme definido pela Resolução 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Também foram detectados níveis elevados de bioacumulação corporal de alguns metais, especialmente ferro (Fe), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), nas amostras de zooplâncton e contaminação das amostras de músculo dos pescados analisados (crustáceos e peixes), acima dos limites permitidos pela legislação vigente, a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC no 42, de 29 de Agosto de 2013 (ANVISA, 2013), que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre "Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos". Diante deste contexto e considerando os impactos observados, o programa de monitoramento ecotoxicológico visa atingir as seguintes metas:

Meta 1- Monitoramento ecotoxicológico do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.

O monitoramento ecotoxicológico do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário será realizado através da avaliação da qualidade da água, do sedimento e da biota. Este monitoramento será baseado em: (a) medidas em campo de parâmetros físico-químicos da água; (b) determinações laboratoriais das concentrações de metais na água, sedimento e biota; (c) modelagem da biodisponibilidade e toxicidade de metais nos ambientes dulcícolas; (d) realização de ensaios ecotoxicológicos com água, sedimento e elutriado de sedimento, utilizando-se espécies de diferentes níveis tróficos; e (e) análise de biomarcadores.

Meta 2- Monitoramento ecotoxicológico da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.

O monitoramento ecotoxicológico da foz do Rio Doce e região costeira adjacente será realizado através da avaliação da qualidade da água, do sedimento e da biota. Este monitoramento será baseado em: (a) medidas em campo de parâmetros físico-químicos da água; (b) determinações laboratoriais das concentrações de metais na água, sedimento e biota; (c) ensaios ecotoxicológicos com água, sedimento e elutriado de sedimento, utilizando-se espécies de diferentes níveis tróficos; e (d) análise de biomarcadores.

Meta 3- Monitoramento ecotoxicológico do ambiente praial.

O monitoramento ecotoxicológico do ambiente praial será realizado através da avaliação da qualidade da água, do sedimento e da biota. Este monitoramento será baseado em: (a) medidas em campo de parâmetros físico-químicos da água; (b) determinações laboratoriais das concentrações de metais na água, sedimento e biota; e (c) análise de biomarcadores.

Meta 4- Monitoramento ecotoxicológico dos manguezais.

O monitoramento ecotoxicológico dos manguezais será realizado através da avaliação da biota. Este monitoramento será baseado em: (a) determinações laboratoriais das concentrações de metais na biota; e (b) análise de biomarcadores.

Meta 5- Monitoramento ecotoxicológico da microbiota.

O monitoramento ecotoxicológico da microbiota será realizado através da avaliação da composição da comunidade microbiana na água e no sedimento do Rio Doce no estado do Espírito Santo, estuário, foz do Rio Doce e região costeira adjacente, bem como em corais de recifes próximos ao sul do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e recifes-controlados fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos.

Meta 6- Monitoramento ecotoxicológico de aves.

O monitoramento ecotoxicológico das aves será baseado em determinações laboratoriais das concentrações de metais e de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio em amostras de sangue e penas de contorno de aves capturadas vivas; ou através de determinações laboratoriais das concentrações de metais e de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio em amostras de sangue, músculo peitoral, fígado, penas de contorno e osso, bem como do conteúdo estomacal de aves abatidas ou encontradas mortas. As amostras de aves marinhas serão coletadas e analisadas conforme descrito no Anexo 6 do TR4.

Meta 7- Monitoramento ecotoxicológico de quelônios e cetáceos.

O monitoramento ecotoxicológico de quelônios e cetáceos será baseado em determinações laboratoriais das concentrações de contaminantes (metais, organoclorados, organobromados e HPAs) em amostras de quelônios e cetáceos encalhados nas praias do litoral norte capixaba, as quais serão coletadas e analisadas conforme descrito no Anexo 6 do TR4.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
- Parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade e concentrações de carbono orgânico dissolvido, sulfatos, Ca, K, Mg, Na e Cl) na água do Rio Doce no estado do Espírito Santo.	Adalto Bianchini e Aloísio J. B. Cotta
- Parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) na água do estuário.	Adalto Bianchini e Aloísio J. B. Cotta
- Concentrações totais e dissolvidas de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) na água do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Adalto Bianchini
- Modelagem (Modelo do Ligante Biótico - BLM) da biodisponibilidade e toxicidade de metais (Cd, Cu, Pb e Zn) na água do Rio Doce no estado do Espírito Santo.	Adalto Bianchini
- Parâmetros de toxicidade aguda e crônica de curta duração da água do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Camila de M. G. Martins
- Concentrações totais de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) no sedimento do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Adalto Bianchini
- Parâmetros de toxicidade aguda do sedimento do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Camila de M. G. Martins

- Parâmetros de toxicidade aguda e crônica de curta duração do elutriato do sedimento do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Camila de M. G. Martins
- Concentrações de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) em organismos do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Adalto Bianchini
- Biomarcadores em organismos do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Adalto Bianchini, Aloísio J. B. Cotta, Juliana C. M. Pirovani, Juliana Z. Sandrini, Marta M. de Souza, Maysa do V. Oliveira e Paola R. Gonçalves
- Parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) da água da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Adalto Bianchini
- Concentrações totais e dissolvidas de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) na água da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Adalto Bianchini
- Toxicidade aguda e crônica de curta duração da água da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Camila de M. G. Martins
- Concentrações totais de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) no sedimento da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Adalto Bianchini
- Parâmetros de toxicidade aguda do sedimento da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Camila de M. G. Martins
- Parâmetros de toxicidade aguda e crônica de curta duração do elutriato do sedimento da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Camila de M. G. Martins
- Concentrações de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) em organismos da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Adalto Bianchini
- Biomarcadores em organismos da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Adalto Bianchini, Aloísio J. B. Cotta, Juliana C. M. Pirovani, Juliana Z. Sandrini, Marta M. de Souza, Maysa do V. Oliveira e Paola R. Gonçalves
- Parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) da água das praias.	Adalto Bianchini e Aloísio J. B. Cotta
- Concentrações totais e dissolvidas de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) na água das praias.	Adalto Bianchini
- Concentrações totais de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) no sedimento das praias.	Adalto Bianchini
- Concentrações de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) em organismos das praias.	Adalto Bianchini
- Biomarcadores em organismos das praias.	Adalto Bianchini, Juliana Z. Sandrini e Marta M. de Souza
- Concentrações de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) em organismos dos manguezais.	Adalto Bianchini
- Biomarcadores em organismos dos manguezais.	Adalto Bianchini, Juliana Z. Sandrini e Marta M. de Souza
- Composição da microbiota na água e no sedimento do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário.	Flávia L. do Carmo
- Composição da microbiota na água e no sedimento da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Flávia L. do Carmo
- Composição da microbiota associada aos corais.	Flávia L. do Carmo
- Concentrações de metais (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn e Hg) nas aves e proporções de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio nas aves.	Adalto Bianchini (Anexo 1) e Leandro Bugoni (Anexo 6)
- Concentrações de metais, organoclorados, organobromados e HPAs nos quelônios.	Adalto Bianchini (Anexo 1) e Marcelo Renan Santos (Anexo 6)

- Concentrações de metais, organoclorados, organobromados e HPAs nos cetáceos.	José Lailson Brito Junior (Anexo 6)
--	-------------------------------------

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
- Avaliação da qualidade da água e do sedimento do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, da foz do Rio Doce e região costeira adjacente e das praias.	Adalto Bianchini, Camila de M. G. Martins e Flávia L. do Carmo
- Avaliação da bioacumulação, transferência trófica e efeitos de metais em organismos do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário e da foz do Rio Doce e região costeira adjacente.	Adalto Bianchini, Aloísio J. B. Cotta, Juliana C. M. Pirovani, Flávia L. do Carmo, Juliana Z. Sandrini, Marta M. de Souza, Maysa do V. Oliveira e Paola R. Gonçalves
- Avaliação da bioacumulação, transferência trófica e efeitos de metais em organismos das praias e dos manguezais.	Adalto Bianchini, Juliana Z. Sandrini e Marta M. de Souza
- Avaliação do nicho trófico das aves e da bioacumulação de metais nas aves.	Adalto Bianchini (Anexo 1) e Leandro Bugoni (Anexo 6)
- Avaliação da bioacumulação de metais e contaminantes orgânicos nos quelônios.	Adalto Bianchini (Anexo 1) e Marcelo Renan Santos (Anexo 6)
- Avaliação da bioacumulação de metais e contaminantes orgânicos nos cetáceos. - Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes.	José Lailson Brito Junior (Anexo 6) Adalto Bianchini

6. METODOLOGIA

6.1. Áreas de Estudo

A coleta de água, sedimento e organismos será realizada em duas grandes regiões amostrais: Rio Doce no estado do Espírito Santo, incluindo a região estuarina, e foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Os 10 pontos de amostragem na área de abrangência do Rio Doce no estado do Espírito Santo, incluindo a região estuarina, estão apresentados na Tabela 1. Por sua vez, os 21 pontos de amostragem na área de abrangência da foz do Rio Doce e região costeira adjacente estão apresentados na Tabela 2.

O objetivo principal das coletas neste primeiro conjunto de estações de amostragem será o de monitorar os parâmetros físico-químicos e a contaminação por metais, bem como investigar os efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição crônica e aguda e os efeitos biológicos da pluma de sedimentos a partir da foz do Rio Doce. No momento da realização das coletas serão registrados dados comuns, tais como coordenadas geográficas (datum SIRGAS2000), data, hora e profundidade em que foi realizada a amostragem.

Tabela 1. Pontos de amostragem na porção capixaba do rio Doce e região estuarina.

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

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

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

O monitoramento das praias adjacentes à desembocadura do Rio Doce será realizado com coletas de água, sedimentos e biota para análises da contaminação por metais e resposta de biomarcadores. A área de abrangência do monitoramento químico e biológico das praias ao longo do litoral será entre os municípios de Aracruz e São Mateus. Foram estabelecidas 10 estações amostrais ao longo deste litoral (Tabela 3). As estações ao longo da planície do Rio Doce estão localizadas na área da Reserva Biológica de Comboios e ao sul, no litoral de Aracruz, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz.

Tabela 3. Pontos de amostragem nas praias adjacentes à foz do rio Doce.

Estações de Amostragem	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Aracruz 1: Refúgio	379908,15	7787892,37
Aracruz 2: Padres	382269,99	7795558,41
Doce Sul 1: Barra do Riacho	389346,33	7807767,56
Doce Sul 2: Comboios	398483,36	7818546,19
Doce Sul 3: Regência	407416,09	7824460,93
Doce Norte 1: Povoação	417863,32	7834350,26

Estações de Amostragem	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Doce Norte 2: Vila de Cacimbas	426646,32	7857980,26
Doce Norte 3: Pontal do Ipiranga	425784,32	7877396,26
Doce Norte 4: Urussuquara	423026,32	7897769,26
Doce Norte 5: Guriri	421308,32	7929528,26

Fonte: Anexo 1, TR4.

No que se refere aos manguezais, conforme descrito no Apêndice V (*Alterações Ecológicas na Dinâmica dos Manguezais e Vegetação de Restinga sob Influência dos Sedimentos Provenientes do Rio Doce*), o monitoramento será realizado em 6 pontos de amostragem na área de influência direta do desastre ambiental do Rio Doce (foz), bem como nas áreas de influência consideradas atualmente como indiretas, a saber: Rios Piraquê (Açú e Mirim), manguezais de franja na área do RVS de Santa Cruz, Rio Urussuquara, Rio Mariricu, Rio São Mateus e Rio Caravelas.

No que se refere às aves, serão monitoradas as tendências nas concentrações de contaminantes em tecidos de aves nas áreas límnicas, estuarinas, costeiras e marinhas potencialmente afetadas pela influência do rompimento da barragem de Fundão em Mariana (MG). Considerando o cenário do impacto em questão, e a heterogeneidade ambiental ao longo das áreas afetadas, foram delimitadas 5 áreas para coleta de amostras visando às análises ecotoxicológicas nas aves: estuário do Rio Doce - Linhares; manguezal na foz do Rio Doce - Linhares; costa adjacente à foz do Rio Doce Norte e Sul; área marinha (amostragem a bordo); e Abrolhos. As coletas e análises de amostras de aves marinhas (amostragem a bordo e Abrolhos) estão descritas no Apêndice VI.

6.2. Periodicidade

A hidrodinâmica no Rio Doce e na região costeira adjacente à sua foz é dependente do regime pluviométrico, bem como dos padrões das correntes marinhas que se estabelecem ao longo do tempo. Portanto, o monitoramento ecotoxicológico será realizado sazonalmente (inverno e verão) ao longo de cada ano de monitoramento.

6.3. Coleta de amostras de água

Serão coletadas amostras de água em cada ponto de coleta na bacia do Rio Doce no estado do Espírito Santo, incluindo a região estuarina (10 pontos de coleta; Tabela 1), bem como na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (21 pontos; Tabela 2), incluindo o ambiente praiial (10 pontos; Tabela 3). As coletas de água ao longo da coluna d'água serão realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal de Niskin. Em todos os pontos serão coletadas amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo) para a análise das concentrações de metais (total e dissolvido). As coletas serão realizadas nas seguintes profundidades: superfície (0 a 15 cm da superfície) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo, conforme a profundidade do local de coleta). Em cada local de amostragem serão coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL de cada amostra) de água não filtrada para as análises dos parâmetros físico-químicos e das concentrações totais de metais. Imediatamente após a coleta, alíquotas das amostras para a determinação das concentrações totais de metais serão acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas. Em cada local de amostragem serão também coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL de cada amostra) de água filtrada (filtro de 0,45 µm de malha) para análise das concentrações de metais dissolvidos. Imediatamente após a coleta, as amostras serão filtradas, acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas e na ausência de luz. Em todas as amostras de água serão analisados os seguintes metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn). No caso das amostras de água do Rio Doce no estado do Espírito Santo, também será realizada a análise da concentração de carbono orgânico dissolvido (amostra filtrada), alcalinidade, concentração de sulfatos e alcalinidade (amostra não filtrada), visando a modelagem (BLM) da biodisponibilidade e toxicidade dos metais, conforme descrito a seguir.

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

No momento da coleta das amostras de água no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, bem como no ambiente praias serão realizadas as medidas da temperatura, condutividade elétrica (salinidade), pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetros. Nas amostras do Rio Doce no estado do Espírito Santo, a concentração de carbono orgânico dissolvido será determinada nas amostras de água filtradas (0,45 µm de malha) utilizando-se um analisador de carbono total (TOC). Os demais parâmetros químicos serão determinados nas amostras de água não filtradas. A concentração de sulfatos será determinada utilizando-se um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Sulfato, CHEMets, EUA), baseado no método turbidimétrico (Tabatabai, 1974). A alcalinidade total será determinada por titulação com solução padrão ácida, utilizando-se um kit comercial de reagentes (Teste de Campo Titulométrico de Alcalinidade, Merck Millipore Brazil, São Paulo, SP, Brasil), baseado no método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (concentrações de Ca, K, Mg e Na) será determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. A concentração de cloretos será analisada utilizando-se um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Cloreto, CHEMets, EUA), baseado no método do tiocianato férrico. Com base nos resultados obtidos nas análises das amostras de água doce provenientes do Rio Doce no estado do Espírito Santo será realizada a modelagem ecotoxicológica dos dados, visando à previsão da biodisponibilidade e toxicidade de metais em ambientes dulcícolas. Esta modelagem será realizada utilizando-se a versão mais recente do Modelo do Ligante Biótico - BLM (Freshwater & Marine version 3.16.2.41).

6.5. Coleta de amostras de sedimentos

Em cada ponto de coleta no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário (Tabela 1), na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Tabela 2), bem como no ambiente praias (Tabela 3), serão coletadas amostras de sedimentos com auxílio de pá ou draga do tipo Van Veen, dependendo do local de coleta. Em cada local de amostragem (10 pontos no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário; 21 pontos na foz do Rio Doce e região costeira adjacente; e 10 pontos na região praias), serão coletadas 4 amostras de sedimento. As amostras serão abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento. As amostras serão fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento. Para a análise de metais, as amostras serão 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, serão coletados aproximadamente 50 g de sedimentos, os quais serão armazenados em pote plástico e mantidos congelados até o momento das análises. Em todas as amostras de sedimento serão analisados os seguintes metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

6.6. Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água

Além das amostras de água e sedimento coletadas para a análise química, conforme descrito acima, amostras adicionais de água e sedimento serão coletadas para realização dos testes de toxicidade. Para tanto, nos pontos de amostragem no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário (10 pontos de amostragem), bem como na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (21 pontos de amostragem), serão coletadas amostras de água superficial e sedimento bruto suficiente para realização dos testes ecotoxicológicos. Nesse caso, será utilizada uma série de bioensaios que avaliam diferentes efeitos biológicos (sobrevivência, reprodução, fertilização e desenvolvimento) em diferentes vias de exposição (água bruta, sedimento inteiro e elutriado), assegurando a investigação completa de efeitos tóxicos potenciais em vários níveis tróficos de cada área estudada (regiões dulcícola, estuarina e marinha). Será dada preferência a organismos nativos específicos de cada região ambiental, para as quais existem procedimentos de ensaio já normatizados, incluindo bioensaios com *zebrafish*, como um modelo consagrado para estudos de ecotoxicologia experimental. Os testes normatizados são priorizados pela relevância e confiabilidade dos resultados, bem como, pela viabilidade de manutenção dos organismos-teste. Os testes previstos estão listados abaixo:

Água doce

Matrizes: água bruta e elutriado

Nível trófico 1 - algas verdes - *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus communis* ou *Pediastrum boryanum* (Chlorophyceae).

ABNT NBR 12648 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).

Nível trófico 2 - *Daphnia ssp* ou *Ceriodaphnia ssp*

OECD 211 - *Daphnia magna* - Reproduction Test ou ABNT NBR 133743 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera).

Nível trófico 3 - Peixe *Danio rerio* (zebrafish)

OECD 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test e ABNT NBR 15499 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes (larvas).

Matriz: sedimento

ABNT NBR 15470 - Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em sedimento - Método de ensaio com *Hyalella spp* (Amphipoda).

Água salgada

Matrizes: água bruta e elutriato

Nível trófico 1 - *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira weissflogii* ou *Isochrysis galbana*

ABNT NBR16181 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas.

Nível trófico 2 - *Echinometra lucunter*

NBR 15350. Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata - Echinoidea).

Nível trófico 3 - espécie nativa a definir

OECD 215 - Fish, Juvenile Growth Test ou OECD 203 - Fish Acute Toxicity Test

Matriz: sedimento

Nitokra sp

Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarinos com anfípodos.

6.7. Coleta de amostras de biota

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos biológicos decorrentes da contaminação da água por metais e consequente acumulação desses metais nos organismos de diferentes níveis tróficos e diferentes habitats, serão realizadas coletas de organismos aquáticos típicos das regiões a serem monitoradas.

No ambiente de água doce (Tabela 1), serão coletadas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de quironomídeos, girinos de anfíbios, uma espécie de crustáceo (camarão de água doce) e quatro espécies de peixes (tucunaré *Cichla sp.*, bagre *Pimelodus maculatus*, curimatá *Prochilodus sp.* e cascudo *Hypostomus affinis*). No ambiente estuarino (Tabela 1), serão coletadas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, uma espécie de crustáceo (camarão) e 4 espécies de peixes (carapicu *Eucinostomus sp.*, corvina *Pachyurus adspersus*, bicudo *Pomadasyus ramosus* e bagre caçari *Genidens genides*). Caso não seja possível a coleta das espécies de peixes listadas acima, as mesmas serão substituídas por outras espécies de peixes que ocupem o mesmo habitat. As amostras de fitoplâncton serão coletadas através de arrastos com rede de malha de 60 µm e diâmetro de boca de 60 cm. Por sua vez, as coletas de zooplâncton, de larvas de quironomídeos e de girinos de anfíbios serão realizadas através de arrastos com rede tipo WP-2 de 60 cm de diâmetro de boca e malha de 200 µm. A coleta de crustáceos e peixes será realizada da forma mais abrangente possível, com utilização dos mais diversos petrechos de pesca (redes de cerco, redes de arrasto, redes de espera, puçás, peneiras, covos e pesca elétrica, quando o ambiente permitir), de acordo com o tipo de ambiente.

Para as análises das concentrações de metais nos organismos do Rio Doce e região estuarina, serão coletadas em cada um dos 10 pontos de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises [5 pools de fitoplâncton com aproximadamente 0,5 g em

cada pool; 5 pools de zooplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de larvas de quironomídeos com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de girinos de anfíbios com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 6 exemplares da espécie de camarão (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio); e 6 exemplares de cada uma das 4 espécies de peixes em estudo (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio)]. Após a biometria, os crustáceos serão adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo será coletada por punção hemolinfática e o organismo será então dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. Após a biometria, os peixes também serão adequadamente anestesiados. O sangue de cada indivíduo será coletado por punção venosa e o organismo será então dissecado para a coleta de músculo, brânquias e fígado. As amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes serão imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, utilizando-se pelo menos duas técnicas de avaliação, conforme será descrito a seguir (item 7.12). As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico. As amostras dos organismos coletados para as análises das concentrações de metais serão acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Estas amostras serão imediatamente congeladas e transportadas para o laboratório, onde serão mantidas congeladas em freezer comum (-20°C), até o momento das análises. Nestas amostras serão analisados os seguintes metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, conforme descrito acima, será também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras serão também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores em tecidos específicos, conforme será detalhado a seguir (item 7.12), para cada grupo de organismos [5 pools de fitoplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de zooplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de larvas de quironomídeos com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de girinos de anfíbios com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 6 exemplares de 1 espécie de camarão (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio); e 6 exemplares de cada uma das 4 espécies de peixes em estudo (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio)]. No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas (crustáceos) ou fígado (peixes) de cada organismo serão coletadas e devidamente acondicionadas, para posterior análise. As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. As amostras dos organismos coletados para as análises de biomarcadores serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para posterior análise de biomarcadores de exposição e de efeito de metais. As análises dos biomarcadores serão realizadas em tecidos específicos dos organismos dulcícolas e estuarinos, considerando-se a natureza de cada biomarcador, conforme detalhado a seguir (item 7.12).

No caso das águas da foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Tabela 2), desde que possível, serão coletados os seguintes organismos em cada um dos 21 pontos de amostragem: fitoplâncton (coleta com rede de fitoplâncton); zooplâncton (coleta com redes de zooplâncton); poliquetos (coleta manual após triagem de sedimento coletado com draga); moluscos (coleta manual ou após triagem de sedimento coletado com draga); macrocrustáceos (coleta com rede de arrasto ou armadilha); peixes (coleta com redes de arrasto, emalhe ou outra arte de pesca). As espécies de macrocrustáceos incluirão o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis* ou *F. brasiliensis*) e o camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*). Por sua vez, as espécies de peixes incluirão o roncadour *Conodon nobilis*, a pescadinha *Cynoscion* sp., o peroá *Balistes caprisacus* e o linguado sem mancha. Caso não seja possível a coleta destas espécies de peixes, as mesmas serão substituídas por outras espécies de peixes que já foram coletadas e analisadas nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Quanto às amostras de corais e hidrocorais (coleta manual por mergulho autônomo), estas serão coletadas nos 3 pontos amostrais em Abrolhos, conforme realizado nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018), na foz do Rio Doce e região costeira adjacente.

Para as análises de concentrações de metais nas amostras dos organismos da Foz do Rio Doce e região costeira adjacente serão coletadas, em cada ponto de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises. Considerando-se a decisão da Câmara Técnica de Biodiversidade (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio) em adotar um número reduzido de exemplares de crustáceos e peixes dulcícolas e estuarinos que cederão amostras para

as análises das concentrações de metais e dos biomarcadores; a necessidade, para fins de análise e modelagem estatística, de balanceamento entre o número de amostras a serem analisadas nos diferentes ambientes (dulcícolas, estuarinos, marinhos, praias e manguezais); a viabilidade de aplicação de modelos estatísticos empregados em ecotoxicologia, bem como os resultados positivos obtidos com o número amostral já utilizado anteriormente nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, adotar-se-á os seguintes números de amostras: fitoplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); zooplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); hidrocorais (6 fragmentos de *Millepora alcicornis* por ponto de coleta); corais (6 fragmentos de *Mussismilia harttii* por ponto de coleta); poliquetos (6 indivíduos por ponto de coleta); moluscos (6 indivíduos por ponto de coleta); macrocrustáceos (6 indivíduos por ponto de coleta e por espécie); peixes (6 indivíduos por ponto de coleta e por espécie). Após a biometria, os crustáceos serão adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo será coletada e o organismo será então dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. Por sua vez, os peixes também serão adequadamente anestesiados. O sangue de cada indivíduo será coletado e o organismo será então dissecado para coleta de músculo, brânquias e fígado. As amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes serão imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, utilizando-se pelo menos duas técnicas de avaliação, conforme será descrito a seguir (item 7.12). As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Estas amostras serão imediatamente congeladas e transportadas congeladas para o laboratório, onde serão mantidas congeladas em freezer comum (-20°C) até o momento das análises de metais. Nestas amostras serão analisados os seguintes metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos da foz do Rio Doce e região costeira adjacente, conforme descrito acima, será também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras serão também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores em tecidos específicos, conforme será detalhado a seguir (item 7.12), para cada grupo de organismos: fitoplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); zooplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); hidrocorais (6 fragmentos de *Millepora alcicornis* por ponto de coleta); corais (6 fragmentos de *Mussismilia harttii* por ponto de coleta); poliquetos (6 indivíduos por ponto de coleta); moluscos (6 indivíduos por ponto de coleta); macrocrustáceos (6 indivíduos por ponto de coleta e por espécie); peixes (6 indivíduos por ponto de coleta e por espécie). No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas (crustáceos) ou fígado (peixes) de cada organismo serão coletadas e devidamente acondicionadas, para posterior análise. As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. As amostras coletadas para as análises de biomarcadores serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para posterior análise de biomarcadores de exposição e de efeito de metais em organismos marinhos. As análises dos biomarcadores serão realizadas em tecidos específicos dos organismos da foz do Rio Doce e região costeira adjacente, considerando-se a natureza do biomarcador, conforme detalhado a seguir (item 7.12).

No ambiente praiar, serão coletados, nos 10 pontos de amostragem (Tabela 3), os seguintes organismos: 1 espécie de poliqueto (triagem manual do sedimento), 1 espécie de anfípodo (triagem manual do sedimento), o isópodo *Excirologana* sp. (triagem manual do sedimento) e o caranguejo *Ocypode quadrata* (coleta manual). Para as análises de concentrações de metais nas amostras dos organismos da região praiar serão coletadas, em cada ponto de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises. Considerando-se os mesmos argumentos apresentados para as coletas de organismos na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, o número de amostras a serem coletadas e analisadas no ambiente praiar será o seguinte: 1 espécie de poliqueto (6 indivíduos por ponto de coleta); 1 espécie de anfípodo (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); isópodo *Excirologana* sp. (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); caranguejo *Ocypode quadrata* (6 indivíduos por ponto de coleta). Após a

biometria, os crustáceos serão adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo será coletada e o organismo será então dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. As amostras de hemolinfa serão imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, utilizando-se pelo menos duas técnicas de avaliação, conforme será descrito a seguir (item 7.12). As amostras de tecidos dos crustáceos serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Estas amostras serão utilizadas para as análises de metais. Portanto, elas serão imediatamente congeladas e transportadas congeladas para o laboratório, onde serão mantidas congeladas em freezer comum (-20°C), até o momento das análises. Nestas amostras serão analisados os seguintes metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme descrito abaixo.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos da região praial, conforme descrito acima, será também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras serão também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores em tecidos específicos, conforme será detalhado a seguir (item 7.12), para cada grupo de organismos: 1 espécie de poliqueto (6 indivíduos por ponto de coleta); 1 espécie de anfípodo (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); isópodo *Excirolana* sp. (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); caranguejo *Ocypode quadrata* (6 indivíduos por ponto de coleta). As amostras de tecidos dos crustáceos serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. As amostras coletadas para as análises de biomarcadores serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para análise de biomarcadores de exposição e de efeito de metais em organismos marinhos. As análises dos biomarcadores serão realizadas em tecidos específicos dos organismos do ambiente praial, considerando-se a natureza do biomarcador, conforme será detalhado a seguir (item 7.12).

Nos manguezais, serão coletados os caranguejos guaiamu (*Cardisoma guanhumi*) e caranguejos-uçá (*Ucides cordatus*) nos 6 pontos de amostragem, conforme os procedimentos descritos no Apêndice V (*Estudo e monitoramento de manguezais - Alterações Ecológicas na Dinâmica dos Manguezais sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce: Barra Nova à Aracruz*). Para os manguezais de franja sobre lateritos do RVS de Santa Cruz, serão coletadas espécies de crustáceos decápodes predominantes naqueles ambientes. Considerando-se os mesmos argumentos apresentados para as coletas de organismos na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, o número mínimo amostral ($n \geq 5$) estabelecido no Anexo 5 do TR4 para as amostragens de caranguejos nos manguezais será aumentado para 6 indivíduos. Assim, serão coletadas, em cada um dos 6 pontos de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises de concentrações de metais nas amostras dos organismos de manguezais: caranguejo guaiamu (6 indivíduos por ponto de coleta) e caranguejo-uçá (6 indivíduos por ponto de coleta). Após a biometria, os caranguejos serão adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo será coletada e o organismo será então dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. As amostras de hemolinfa serão imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, utilizando-se pelo menos duas técnicas de avaliação, conforme será descrito a seguir (item 7.12). As amostras de tecidos dos caranguejos serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. As amostras coletadas para as análises de metais serão imediatamente congeladas e transportadas para o laboratório, onde serão mantidas congeladas em freezer comum (-20°C), até o momento das análises. Nestas amostras serão analisados os metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos de manguezais, conforme descrito acima, será também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras serão também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores em tecidos específicos, conforme será detalhado a seguir (item 7.12), para cada grupo de organismos: caranguejo guaiamu (6 indivíduos por ponto de coleta) e caranguejo-uçá (6 indivíduos por ponto de coleta). As amostras de tecidos dos caranguejos serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. As amostras coletadas para as análises de biomarcadores serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou em ultrafreezer (-80°C), para posterior análise de biomarcadores de exposição e de efeito de metais nos organismos de manguezal. As análises dos

biomarcadores serão realizadas em tecidos específicos dos caranguejos dos manguezais, considerando-se a natureza do biomarcador, conforme será detalhado a seguir (item 7.12).

6.8. Avaliação da microbiota na água, sedimentos e corais

O monitoramento da comunidade microbiana total em amostras de água, sedimentos e associada aos corais, será realizado utilizando-se triplicatas das amostras em cada ponto de coleta (total de até 12 amostras por ponto de coleta). As coletas de água e sedimento serão realizadas nos 10 pontos de amostragem do Rio Doce no estado do Espírito Santo (Tabela 1) e nos 21 pontos de amostragem na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Tabela 2). Por sua vez, as amostras de corais serão coletadas nos 3 pontos de monitoramento no Parque Nacional Marinho de Abrolhos e em recifes-controle fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos. As análises da microbiota total em amostras de água, sedimentos e associada aos corais serão realizadas através da extração do DNA total, utilizando o *PowerSoil DNA isolation kit* (MoBio, USA), e posterior sequenciamento de DNA, utilizando-se sequenciadores de nova geração. As leituras geradas serão processadas utilizando o programa Mothur v.1.33. A análise das sequências obtidas permitirá a avaliação do core microbiano e os microrganismos presentes nas diferentes amostras, nos diferentes pontos e nos diferentes tempos de coleta, correlacionando estatisticamente os resultados de diversidade microbiana obtidos com as demais análises realizadas no programa de monitoramento, com concomitante análise de possíveis impactos que estejam presentes em pontos de coleta ao longo do tempo. Essa avaliação permitirá não apenas indicar possíveis alterações ambientais temporais e/ou pontuais, como ainda apontar bioindicadores microbianos específicos da presença de sedimentos e/ou de impactos nas diferentes áreas amostradas, que podem ser rastreados em áreas adjacentes.

6.9. Coleta de amostras de aves

No que se refere às aves marinhas, as coletas e análises das amostras serão realizadas conforme descrito no Apêndice VI. Por sua vez, o monitoramento da bioacumulação de contaminantes nas aves estuarinas, de manguezais e da região costeira considerará as espécies conforme seus diferentes hábitos alimentares/guildas tróficas, a fim de compreender o quadro de contaminação dos organismos e a biomagnificação dos contaminantes ao longo da cadeia trófica. No que se referem às variações temporais, assim como para os demais organismos em avaliação, a frequência de amostragem das aves estuarinas, de manguezais e da região costeira será sazonal (inverno e verão). Devido à grande heterogeneidade ambiental ao longo do curso do rio afetado pelo evento não é possível antever quais espécies estarão presentes nas 3 áreas amostrais (estuário, manguezal e região costeira) e assim, definir a amostragem em nível específico. Por isso, serão realizadas coletas de espécies de aves estuarinas, de manguezais e da região costeira que representem os hábitos alimentares relacionados aos ambientes dulcícola e estuarino, conforme as famílias relacionadas na Tabela 4. Assim, em cada uma das 3 áreas amostrais dos ambientes dulcícolas e estuarinos será coletada uma espécie de cada grupo alimentar, de acordo com a Tabela 4, conforme a sua abundância local e buscando atender à lista de priorização associada. As espécies que serão capturadas em cada local de amostragem serão selecionadas com base em dados de abundância, priorizando sempre aquelas mais abundantes, a fim de que a coleta não resulte em impactos populacionais e que viabilize a obtenção de amostras das mesmas espécies ao longo de todo o período de monitoramento. Serão obtidas amostras de, no mínimo, dois indivíduos da mesma espécie por área de amostragem, por estação do ano (inverno e verão). Será priorizada a amostragem não letal, por captura manual ou com rede-de-neblina, ou amostragem de indivíduos encontrados mortos. Serão realizadas amostragens com redes-de-neblina nos diferentes ambientes das áreas pré-definidas, fazendo uso de uma linha de 10 redes de 12 m ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados, visando à obtenção não letal de amostras em 10 indivíduos/área amostral/estação do ano (inverno e verão). Em caso de ausência da guilda trófica/hábito alimentar, a mesma será devidamente justificada com base em bibliografia especializada e em dados de abundância.

Tabela 4. Lista das famílias de aves estuarinas, de manguezais e da região costeira a serem amostradas no monitoramento de contaminantes, com seu respectivo hábito alimentar e exemplo de espécies a serem priorizadas quando presentes na área amostral.

Hábito Alimentar/Guilda Trófica	Famílias	Exemplos de espécies a serem priorizadas
Invertebrados aquáticos, ovos e	Anseridae, Rallidae,	<i>Charadrius collaris</i> , <i>Actitis</i>

Hábito Alimentar/Guilda Trófica	Famílias	Exemplos de espécies a serem priorizadas
larvas de anfíbios, pequenos vertebrados e de origem vegetal.	Charadriidae, Scolopacidae	<i>macularius</i> , <i>Aramides saracura</i> , <i>Gallinula galeata</i>
Filtradores, plantas aquáticas e invertebrados	Anatidae	<i>Dendrocygna autumnalis</i> , <i>Dendrocygna viduata</i> , <i>Amazonetta brasiliensis</i>
Peixes e invertebrados aquáticos	Podicipedidae, Ardeidae, Cerylidae	<i>Egretta caerulea</i> , <i>Egretta thula</i> , <i>Chloroceryle americana</i>
Piscívoras	Phalacrocoracidae, Sternidae, Rynchopidae, Alcedinidae	<i>Phaetusa simplex</i> , <i>Rynchops niger</i>
Malacófagos	Acciptridae*, Aramididae	* <i>Rostrhamus sociabilis</i>

Fonte: Anexo 1, TR4.

Para os espécimes capturados com rede-de-neblina, serão coletadas as seguintes amostras: sangue (máximo de 1% da massa corporal da ave em microtubo ou frasco de 1,5 ml, sem anticoagulante) e penas de contorno (mínimo de 5 a 10 penas). Em caso de aves abatidas ou encontradas mortas, o sangue será obtido nos coágulos cardíacos. As amostras de sangue serão resfriadas em campo e congeladas tão logo seja possível. Por sua vez, as penas serão armazenadas a seco em sacos plásticos tipo zip-loc. Os tipos de amostras a serem obtidos de cada ave coletada incluirão sangue coagulado, músculo peitoral, fígado, penas de contorno e osso (fêmur). Além disso, para interpretação dos resultados quantitativos de contaminação, serão obtidas informações de aspectos tróficos de cada ave coletada. Assim, o conteúdo estomacal terá seus itens alimentares analisados e quantificados (identificação taxonômica dos itens alimentares e quantificação da frequência de ocorrência absoluta e relativa; FO e FO%, respectivamente), contribuição numérica absoluta e relativa (N e N%, respectivamente) e contribuição em massa medida com balança de precisão ou reconstituída, absoluta e relativa (M e M%, respectivamente). Os parâmetros para análise de conteúdo estomacal são aqueles definidos em Faria *et al.* (2016). Para a interpretação dos dados de bioacumulação de contaminantes ao longo da cadeia trófica, será realizada a análise simultânea de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) nos tecidos dos mesmos indivíduos amostrados. Assim, uma alíquota do sangue (5-6 gotas) e de pena em crescimento (5-6 penas), ou seja, ainda com bulbo contendo sangue, será analisada quanto aos isótopos estáveis. Para comparação com os valores isotópicos das aves, serão obtidas amostras de tecido de pelo menos 3 itens alimentares de cada espécie de ave, indicadas a partir da análise do conteúdo estomacal e/ou observações de forrageamento em campo e literatura pertinente. A preparação e análise das amostras de aves e seus potenciais presas seguirá os protocolos descritos em Faria *et al.* (2016). Os dados isotópicos serão analisados através de modelos bayesianos de misturas isotópicas, conforme descritos em Faria *et al.* (2016).

Para as aves que serão abatidas, serão coletadas amostras de sangue, músculo, fígado, penas e osso de 2 indivíduos, de 2 espécies de cada guilda trófica, conforme indicado na Tabela 4, em cada uma das 3 áreas indicadas para o monitoramento de aves estuarinas, de manguezais e da região costeira. No caso das coletas não letais, serão então amostrados somente sangue e penas, porém de 10 indivíduos. Assim, serão abatidas no máximo 20 aves em cada uma das 3 áreas de amostragem, sendo coletados 5 tecidos de cada indivíduo. Porém, será priorizada a amostragem não letal. Neste caso, serão coletadas amostras de penas e sangue, sendo que um número maior de indivíduos (10) será amostrado, mantendo-se assim o número total de amostras de penas e sangue, independentemente do método de coleta. Os dados de concentrações de metais nas penas e no sangue de aves marinhas (Apêndice VI) serão comparados com amostras de 10 indivíduos por espécie que foram coletados previamente ao evento de rompimento da barragem.

6.10. Coleta e análise das concentrações de contaminantes em amostras de quelônios e cetáceos

As coletas das amostras para análises das concentrações de contaminantes em amostras de quelônios e cetáceos serão realizadas no âmbito do Apêndice VI. Nas amostras de tecidos de quelônios e cetáceos deverão ser realizadas as análises de microcontaminantes e metais. As amostras de quelônios serão analisadas no âmbito do presente Apêndice (Apêndice I). Por sua vez, as amostras de cetáceos serão analisadas no âmbito do Apêndice VI.

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), as amostras de quelônios serão tratadas a frio com 1 mL de H₂O₂. Após essa etapa, serão adicionados 5 mL de solução sulfonítrica concentrada (H₂SO₄-HNO₃; v/v) e as amostras serão então aquecidas em banho-maria a 60°C por 2 h, até a solubilização completa da amostra. Os extratos serão resfriados por 15 min, e 10 mL de KMnO₄ (5%) serão adicionados aos extratos. As amostras serão retornadas ao banho-maria (60°C) por 15 min, e serão então resfriadas em repouso, por uma noite. No dia seguinte, o extrato será reduzido com a adição de 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (HONH₂) a 12%. O extrato final será avolumado com água MilliQ até 14 mL. As leituras serão realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio. A certificação do método de determinação do HgT será feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de peixe) e DORM-4 (músculo de peixe) do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC). Serão usados brancos analíticos em todas as baterias analíticas.

A determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cr, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) nas amostras de quelônios será realizada através de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), utilizando-se de um espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Para tal, uma solução de nitrato de paládio (Pd(NO₃)₂) será utilizada como modificador químico e, conseqüentemente, adicionada a cada solução a ser analisada. Esta solução será preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS (Merck No.B9366989 710). O controle de qualidade será efetuado através do uso de materiais certificados de referência (DOLT-5 e DORM-4) do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC).

Para a determinação de compostos organoclorados nas amostras de quelônios, as extrações serão realizadas com aparelhos de Soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 125 mL, os quais serão aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. Será utilizada uma mistura de solventes (hexano e diclorometano; 1:1; v/v). Serão utilizados cerca de 8 g de amostra (peso seco). Os padrões internos de PCB 103 e PCB 198 serão adicionados às amostras. O volume final será reduzido, para dar então prosseguimento à etapa de purificação, com a adição de H₂SO₄ (Santos-Neto *et al.*, 2014). O conteúdo lipídico das amostras será quantificado por gravimetria. Portanto, as concentrações finais dos compostos organoclorados serão normalizadas a partir do conteúdo de lipídios na amostra analisada. As concentrações dos pesticidas e das bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa, com detector de captura de elétrons (GC/ECD). O hidrogênio será utilizado como gás de arraste enquanto o nitrogênio será empregado como gás auxiliar (make up). O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

Para a determinação de compostos organobromados nas amostras de quelônios, as extrações serão realizadas com aparelhos de Soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 125 mL, os quais serão aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. Uma mistura de hexano e diclorometano (1:1; v/v) será utilizada. Serão utilizadas cerca de 8 g de amostra (peso seco). Os padrões internos PBDE-181 e PBDE-209 serão adicionados às amostras. O volume final será reduzido, para dar então prosseguimento à etapa de purificação. O método utilizado para purificação de amostras é aquele descrito e validado por Covaci e Koppen (2002) e Voorspoels *et al.* (2003). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria, sendo que as concentrações finais dos compostos organobromados serão então normalizadas considerando-se o conteúdo de lipídios na amostra analisada. As concentrações dos PBDEs e MeO-PBDEs serão mensuradas utilizando-se cromatógrafo de fase gasosa (GC) acoplado a espectrômetro de massa (MS). O GC será operado no modo de ionização química negativa (ECNI). O metano será utilizado como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadrupólo e interface serão ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS será utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons m/z = 79 e 81 (de tri- a hepta-BDEs) e 484,7/486,7 e 494,7/496,7 (para BDE 209 e 13C-BDE 209, respectivamente), sendo monitorados durante toda a corrida. O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

A metodologia de análise de HPAs nas amostras de quelônios será adaptada e otimizada a partir de procedimento descrito pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (USEPA, 2014). Resumidamente, as alíquotas das amostras liofilizadas serão pesadas e extraídas em Soxhlet com metanol, seguidas pela reação de saponificação através da adição de hidróxido de potássio. Posteriormente, será conduzida uma extração líquido-líquido com hexano, onde a amostra será transferida para um funil de separação, onde será adicionado hexano, sendo que através de agitação manual, o extrato de hexano será separado e recolhido em novo balão. Tal procedimento será repetido por 3 vezes, sendo que todo o extrato de hexano será recolhido e então reduzido a cerca de 1 mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos serão purificados através de clean up, a ser realizado em colunas de vidro. Ao extrato reduzido em Turbo vap, será adicionado o padrão interno, visando a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs serão realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS).

6.11. Análises das concentrações de metais nas amostras de água, sedimentos, invertebrados, peixes e aves

As análises das concentrações dos metais As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de água, sedimento, invertebrados (indivíduos inteiros ou tecidos), peixes (tecidos) e aves (tecidos) serão realizadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Por sua vez, a análise da concentração de Hg nestas amostras será realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica.

Para as análises de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn, as amostras de água filtradas e não filtradas oriundas dos pontos amostrais da Foz do Rio Doce e região costeira adjacente serão dessalinizadas, a fim de minimizar um possível "efeito matriz" associado às altas concentrações de íons presentes na água salgada (Nadella *et al.*, 2009). Para tal, os metais representativos presentes em 1 mL de amostra de água serão precipitados adicionando-se 1 μ L de óxido de lantânio (10 mg La/mL) e 7,5 μ L de carbonato de sódio (1 M), o que elevará o pH da amostra para aproximadamente 9,8. A solução será então gentilmente agitada em banho-maria (80°C) por 30 min para promover a floculação do precipitado, na sua maioria constituído de hidróxido de lantânio. A solução resultante será então centrifugada a 3.000 xg por 15 min, sendo que o sobrenadante obtido será descartado. O precipitado remanescente será dissolvido em 1 mL de ácido nítrico (HNO₃, 1 N) ultrapuro (Suprapur, Merck) e utilizado na determinação da concentração dos metais. As análises das concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn em todas as amostras de água (doce, estuarina e marinha) serão realizadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Por sua vez, a análise da concentração de Hg nestas amostras será realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica. As concentrações totais e dissolvidas dos metais nas amostras de água serão expressas em μ g/L e comparadas com a Resolução CONAMA 357/2005 (CONAMA, 2005), respeitando-se o tipo (água doce, salobra ou marinha) e as classes de qualidade de cada amostra de água em análise. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, serão realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, serão analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras serão igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, serão utilizadas soluções padrões certificadas do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC) para os metais a serem analisados nos diferentes tipos de águas analisadas (NASS-6: água marinha; SLEW-3: água salobra; SLRS-6: água doce). Os percentuais de recuperação dos metais nas soluções padrões certificadas, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os metais analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, e Zn), serão apresentados.

As amostras de material biológico serão previamente secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO₃) ultrapuro (Suprapur, Merck) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. O teor de água para cada amostra será obtido. As amostras serão então submetidas à digestão ácida lenta em tubos plásticos tipo Eppendorf, os quais serão devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até a completa digestão das amostras. As amostras contendo o material biológico digerido serão então avolumadas a 1 mL com água tipo MilliQ. No momento das análises, caso necessário, as amostras serão diluídas utilizando-se água tipo MilliQ, visando se adequar as concentrações dos metais nas amostras àquelas presentes nas soluções padrões certificadas utilizadas para calibrar o equipamento. As concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de material biológico, preparadas conforme descrito acima, serão analisadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica de alta resolução. Por sua vez, a análise da concentração de Hg nestas amostras será realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador

de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica. As concentrações dos metais no material biológico serão expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e µg/g de peso seco (mg/kg de peso seco). Os resultados das amostras de músculo de crustáceos e peixes serão comparados com os limites estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº 42, de 29/08/2013 (ANVISA, 2013), que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, serão realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, serão analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras serão igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, serão analisados materiais de referência certificados para análise de metais traços do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC), de acordo com o material biológico analisado (DOLT-5: fígado de peixe; DORM-4: músculo de peixe; TORT-3: hepatopâncreas de lagosta). Amostras destes materiais serão tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico coletado no monitoramento, conforme descrito anteriormente. Os percentuais de recuperação dos metais presentes nos materiais de referência certificados, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os metais analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, e Zn), serão apresentados.

As amostras de sedimentos, coletadas conforme descrito acima, serão tratadas com digestão ácida, conforme os procedimentos descritos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996). As concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de sedimento serão analisadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica de alta resolução. Por sua vez, a análise da concentração de Hg nestas amostras será realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica. As concentrações dos metais no sedimento serão expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e µg/g de peso seco (mg/kg de peso seco). Para verificar a acurácia e exatidão das análises, serão realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, serão analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras serão igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, será utilizado material de referência certificado do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC) para os metais a serem analisados (MESS-4). Amostras deste material serão tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras de sedimento coletadas no monitoramento, conforme descrito anteriormente. Os percentuais de recuperação dos metais presentes no material de referência certificado, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os metais analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, e Zn), serão apresentados.

6.12. Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes

Biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente e podem ser mensuradas em nível molecular, celular e fisiológico (Walker et al., 1996). Portanto, os biomarcadores selecionados para um programa de monitoramento ambiental devem detectar a exposição do organismo aos contaminantes através de qualquer alteração biológica mensurável (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude de resposta do organismo aos contaminantes (biomarcadores de efeito). Assim, os biomarcadores serão analisados de forma seletiva nas amostras de invertebrados e peixes coletados no presente programa de monitoramento, considerando-se os potenciais efeitos biológicos dos metais (desequilíbrio iônico e osmótico, inibição enzimática, oxidação de biomoléculas, danos morfológicos e desequilíbrio endócrino) nos respectivos tecidos e organismos a serem analisados, bem como a quantidade de amostra disponível para a realização das análises em questão e os resultados já obtidos nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Os biomarcadores a serem analisados nas respectivas amostras de tecidos e organismos coletados no presente programa de monitoramento ambiental encontram-se listados abaixo (Tabela 5).

Tabela 5. Lista dos biomarcadores a serem analisados nas amostras de organismos coletados nas diferentes áreas de monitoramento.

Amostra	Biomarcador
Fitoplâncton	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Zooplâncton	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Composição iônica corporal (efeito)

Larvas de quironomídeos	Concentração de metalotioneínas (exposição) Composição iônica corporal (efeito) Atividade da Na,K-ATPase (efeito)
Girinos de anfíbios	Concentração de metalotioneínas (exposição) Composição iônica corporal (efeito) Atividade da Na,K-ATPase (efeito)
Poliquetos, anfípodos, isópodos e moluscos	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Hemolinfa de camarões dulcícolas e estuarinos	Composição iônica hemolinfática (efeito) Danos de DNA (efeito)
Hemolinfa de camarões marinhos e de caranguejos de manguezais e de praias.	Danos de DNA (efeito)
Brânquias de camarões dulcícolas e estuarinos	Atividade da Na,K-ATPase (efeito) Peroxidação lipídica (efeito)
Brânquias de camarões marinhos e de caranguejos de manguezais e de praias	Peroxidação lipídica (efeito)
Hepatopâncreas de camarões (dulcícolas, estuarinos e marinhos) e caranguejos (manguezais e praias)	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Sangue de peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Composição iônica plasmática (efeito) Danos de DNA (efeito) Desreguladores endócrinos (efeito)
Brânquias de peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Atividade de enzimas antioxidantes (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Fígado de peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Atividade de enzimas antioxidantes (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos
Músculo de camarões (dulcícolas, estuarinos e marinhos), caranguejos (manguezais e praias) e peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Oxidação de proteínas (efeito)
Corais e hidrocorais	Peroxidação lipídica (efeito) Atividade de enzimas envolvidas na calcificação (efeito)

As metodologias a serem empregadas para as análises dos biomarcadores listados na Tabela 6 encontram-se descritas abaixo. Porém, para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, sempre que possível serão utilizados kits comerciais de reagentes específicos que utilizem metodologia semelhante àquelas descritas abaixo para a determinação dos respectivos biomarcadores.

Concentração de metalotioneínas

A determinação da concentração de metalotioneínas será realizada conforme descrito por Viarengo *et al.* (1997). A amostra será homogeneizada e centrifugada (6.000 xg) durante 10 min. O sobrenadante será descartado e o precipitado será homogeneizado com 1 mL de etanol 87% e clorofórmio 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM). A solução resultante será centrifugada a 6.000 xg durante 10 min. O sobrenadante será novamente descartado e o novo precipitado obtido será homogeneizado em 150 µL de NaCl (250 mM) e serão adicionados posteriormente 150 µL de solução de EDTA (4 mM) e HCl (1 N). A seguir, 100 µL de cada amostra (em duplicata) serão adicionadas a 1,4 mL de solução de DTNB preparada em um tampão (pH 8,0) contendo Na₂HPO₄·7H₂O (200 mM), NaCl (2 M) e DTNB (0,43 mM). Após nova centrifugação a 3.000 xg por 5 min, 350 µL do sobrenadante obtido a partir de cada amostra serão então transferidos, em duplicata, para as poças de uma microplaca. A leitura de absorbância (405 nm) será feita em espectrofotômetro de microplacas. Os resultados serão expressos em µmol GSH/g de peso úmido de tecido. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (*Fish Metallothionein ELISA Kit*, fornecido

pela MyBiosource; ou outro kit similar), cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

Composição iônica corporal, hemolinfática ou plasmática

Para a determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados serão coletados, rapidamente (30 s) lavados em água tipo MilliQ, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa (70°C), será determinado o peso seco do material digerido e este digerido em ácido nítrico 65% (SupraPur, Merck). Após completa digestão, as amostras serão apropriadamente diluídas para a análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), as quais serão determinadas por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. Por sua vez, a concentração de cloretos será analisada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Os resultados serão expressos em mg/g de peso úmido. No que se refere à composição iônica hemolinfática e plasmática, esta será analisada nas amostras de hemolinfa (crustáceos) e sangue (peixes) que foram coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As análises dos íons (Ca, K, Mg, Na e Cl) serão realizadas conforme descrito para a análise da composição corporal.

Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

As amostras de material biológico para a determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase serão preparadas com base nos procedimentos descritos por Péqueux e Chapelle (1982). As amostras, coletadas conforme descrito acima, serão homogeneizadas num meio contendo 1 mL de tampão SI (sacarose - Imidazol em pH 7,6) e mantidas em banho de gelo. Após serão centrifugadas a 5.000 rpm e a 5°C, por 5 min. O sobrenadante obtido será coletado para determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, a qual será determinada utilizando-se um método colorimétrico. Para tal, serão usados 100 mL do sobrenadante do homogeneizado, onde serão adicionados 2,5 mL de uma solução salina A contendo 77 mM de NaCl; 20 mM de KCl; 6 mM de MgCl₂ e 3 mM de ATP. O pH da solução será ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras serão incubadas durante 60 min a 25°C, no escuro e a leitura será feita a 620 nm. A mesma reação será realizada com 100 µL de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina B contendo 83 mM de NaCl; 6 mM de MgCl₂, 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína. Ambas as reações serão mantidas por 1 h, quando então serão inibidas pela adição de ácido tricloroacético 50%. A quantidade de fósforo produzido em cada reação será determinada utilizando-se um kit de reagentes específicos para a determinação do fósforo. A diferença na produção de fósforo entre as duas reações realizadas acima será então considerada como sendo aquela atribuída à atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. A concentração da proteína no homogeneizado será determinada colorimetricamente, com base no método de Bradford, usando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade da enzima será então expressa em mmoles Pi/mg proteína/h. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (*Na⁺/K⁺ ATPase Assay Kit*, fornecido pela MyBiosource; ou outro kit similar), cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

Atividade de enzimas envolvidas na calcificação

A preparação das amostras para análise dos parâmetros de calcificação será realizada macerando-se as amostras em nitrogênio líquido e separando-as em alíquotas de 150-200 mg. Para cada análise, as amostras serão homogeneizadas em tampão específico (1:1; peso/volume) para cada ensaio, com o auxílio de um sonificador. As amostras homogeneizadas serão então centrifugadas (10.000 xg, 20 min, 4°C) e o sobrenadante coletado para as análises, sendo imediatamente utilizado para as medidas de atividade enzimática (Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase e anidrase carbônica). A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas será realizada baseando-se no método de Bradford.

A determinação da atividade da anidrase carbônica será realizada medindo-se a redução de pH associada à catálise da hidratação do CO₂, com a correspondente liberação de H⁺ (Henry, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras será constituído de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritiotreitól (DTT 1 mM). Para isso, 15 µL do homogeneizado serão adicionados a 3 mL de uma solução de reação composta por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). Em seguida, serão adicionados 280 µL de substrato (água destilada saturada com CO₂) e o pH registrado a cada 5 s, durante 30 s, com o auxílio de um pHmetro de bancada. Paralelamente, serão realizadas determinações do "branco de reação", onde 15 µL do tampão de homogeneização serão adicionados à solução de reação e ao substrato. Será utilizado o modelo de regressão linear (variável dependente: pH, variável independente: tempo) para determinar a

declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos nos homogeneizados será a taxa de reação catalisada, enquanto a média dos dados obtidos nos brancos indicará a taxa da reação não catalisada. Os resultados serão normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e expressos em unidades de anidrase carbônica/mg proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (*Fish Carbonic Anhydrase ELISA Kit*, fornecido pela MyBiosource; ou outro kit similar), cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

A determinação das atividades da Ca^{2+} -ATPase e da Mg^{2+} -ATPase será realizada utilizando-se o método descrito por Vajreswari *et al.* (1983), com modificações. O homogeneizado da amostra será preparado utilizando-se tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado será centrifugado (20 min, 10.000 xg, 4°C) e 20 μL do sobrenadante serão utilizados para a análise. O meio de reação utilizado na análise da atividade da Ca^{2+} -ATPase será composto por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), CaCl_2 (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação será realizada a 30°C, por 30 min. Por sua vez, o meio de reação utilizado na análise da atividade da Mg^{2+} -ATPase será composto por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), EGTA (0,2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação será realizada a 30°C, por 30 min. No início da incubação, ATP (3 mM) e ouabaína (1mM) serão adicionados aos meios de reação. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação será determinada utilizando-se o método colorimétrico (630 nm). Os resultados serão normalizados com base na quantidade de proteínas totais presentes nos homogeneizados e serão expressos em mM Pi/mg proteína/min. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (*Ca-ATPase ELISA Kit* fornecido pela MyBiosource; ou outro kit similar), cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

Atividades de enzimas do metabolismo energético

As atividades da lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) serão analisadas em homogeneizados das amostras das brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima. Os homogeneizados das amostras de brânquias e fígado serão realizados por maceração mecânica em mistura contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton x 100. Após centrifugação, o sobrenadante obtido será utilizado para as análises das atividades da LDH e MDH. A avaliação da atividade da LDH será realizada pela mistura de solução de piruvato de sódio (1 mM), KCl (100 mM), tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e NADH (250 μM) a uma alíquota do sobrenadante de cada homogeneizado de brânquia ou fígado. Para a determinação da atividade da MDH, serão adicionados à alíquota do sobrenadante dos homogeneizados uma solução de ácido oxaloacético (0,4 mM), MgCl_2 (20 mM), NADH (150 μM) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas serão aqueles descritos por Thuesen *et al.* (2005) e Childress e Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, e adaptada por Ribeiro *et al.* (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas em análise será determinada por espectrofotometria UV em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados será realizada pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas serão expressas em U/mg de proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderão ser utilizados kits comerciais de reagentes (*Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit* e *Malate Dehydrogenase Activity Assay Kit*, fornecidos pela Sigma-Aldrich; ou outros kits similares), cujos princípios de análise também estão baseados em métodos espectrofotométricos.

Atividades de enzimas antioxidantes

As atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) serão analisadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no item "*Atividades de enzimas do metabolismo energético*". A atividade da CAT será determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme descrito por Beutler (1975). Por sua vez, a atividade da SOD será analisada medindo-se o grau de redução do citocromo C, conforme descrito por McCord e Fridovich (1969). A dosagem de proteínas dos homogeneizados será realizada pelo método de Bradford. As atividades da CAT e da SOD serão expressas em U/mg de proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderão ser utilizados kits comerciais de reagentes, cujos princípios de análise também estão baseados em métodos espectrofotométricos em microplaca (*Catalase Assay Kit* e *Superoxide Dismutase Assay Kit*, fornecidos pela MyBiosource; ou outros kits similares).

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) será determinada nas amostras do material biológico utilizando-se o método fluorescente baseado nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Oakes e van Der Kraak (2003). Este método quantifica os danos em lipídios por meio da reação do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação ocorre em condições de acidez e alta temperatura (95°C), gerando um cromógeno fluorescente. Para serem analisadas, as amostras serão homogeneizadas (1:9; peso:volume) utilizando-se uma solução tampão. A fluorescência gerada (emissão: 520 nm; excitação: 580 nm) será medida utilizando-se um espectrofluorímetro. Os dados serão calculados com base em uma curva construída com soluções padrões de tetrametoxipropano (TMP), que após hidrólise gera MDA. Os resultados serão normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, o qual será determinado utilizando-se o método de Bradford. Os dados serão expressos em nmol MDA/mg proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes, cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca [*Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit*, fornecido pela MyBiosource; ou outro kit similar].

Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas serão analisados utilizando-se o método descrito por Dalle-Donne *et al.* (2003). Portanto, para quantificar a concentração de proteínas carboniladas nas amostras biológicas serão utilizadas as técnicas de eletroforese unidimensional e de ensaio imunológico por "Western blotting". Neste caso, a detecção das proteínas carboniladas envolve a derivatização do grupamento carbonil com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), a qual leva à formação de um produto estável, a 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP). Antes da derivatização, o conteúdo de proteínas da amostra será padronizada em 0,2 mg/ml de homogenizado, visando normalizar as amostras para a realização do ensaio de eletroforese (SDS-PAGE) e "Western blotting". No processo de derivatização, as proteínas reagirão com DNPH em uma solução contendo 12% SDS e uma solução de DNPH/TFA [20 mM DNPH em 20% (v/v) de TFA (ácido trifluoroacético)]. Adicionalmente, três amostras servirão como controle positivo, as quais conterão 1, 2 e 4 mM de H₂O₂ para induzir o dano oxidativo na amostra. Após incubação por 15 min na temperatura ambiente, a mistura de reação será neutralizada com uma solução 2M de Tris-Base contendo 30% de gliceraldeído. Para cada amostra, as proteínas derivatizadas com DNPH serão separadas para eletroforese unidimensional em gel de poliácridamida 12% (1D SDS-PAGE), eletroprecipitadas em membranas de PVDF e submetidas ao ensaio imunológico para determinação do conteúdo de proteínas carboniladas com um anticorpo anti-DNP (Invitrogen, EUA). As bandas obtidas serão visualizadas utilizando-se um kit de reagentes para imunodeteção colorimétrica (Invitrogen, EUA). As densidades das bandas obtidas serão analisadas para cada amostra após escaneamento da membrana de PVDF. Os resultados serão expressos em pixels de densidade ótica. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes, cujo princípio de análise de proteínas oxidadas é semelhante àquele descrito acima, porém que utiliza um método espectrofotométrico em microplaca (*Protein Carbonyl ELISA Kit*, fornecido pela Cell Biolabs; ou outro kit similar).

Dano de DNA

O Anexo 1 do TR4 prevê cinco metodologias diferentes para avaliação de danos à molécula de DNA (detecção de sítios AP através de kit comercial, ensaio do vermelho neutro, teste de micronúcleo, ensaio cometa, e detecção de caspases por imunohistoquímica), conforme descrito a seguir. Considerando que todas estas metodologias estão associadas ao mesmo biomarcador de efeito (danos ao DNA) e, portanto, fornecem dados semelhantes, as amostras de hemolinfa de crustáceos e sangue de peixes coletados nos pontos mencionados anteriormente serão testadas através de, pelo menos, duas destas técnicas, principalmente em função da disponibilidade de material coletado em campo. Esta abordagem permite a avaliação de danos ao material genético, conforme originalmente proposto no Anexo 1 do TR4, mesmo em condições limitantes de quantidade de material biológico disponível e de processamento deste material campo. Cabe salientar que esta abordagem também viabiliza a possibilidade de comparação dos resultados obtidos com diferentes técnicas de análise de dano ao DNA nas amostras coletadas durante o monitoramento.

Para a análise de danos oxidativos no material genético, o DNA genômico poderá ser isolado utilizando-se um kit de reagentes para isolamento de DNA (*DNA isolation kit*, fornecido pela PromoKine, Promocell; ou outro kit similar). Por sua vez, a análise de danos oxidativos no DNA será realizada com base na identificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP). Os sítios AP serão

medidos utilizando-se uma sonda capaz de reagir com o grupo aldeído destes sítios, a qual será detectada por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para tal, será utilizado um kit de reagentes de detecção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (*DNA Damage Detection Kit*, fornecido pela Promokine, Promocell; ou outro kit similar). Os resultados serão expressos em sítios AP/mg de proteína, considerando a concentração de proteínas nas amostras, a qual será determinada utilizando-se o método de Bradford.

O ensaio do vermelho neutro poderá ser realizado com os hemócitos presentes nas amostras de hemolinfa dos crustáceos (camarões e caranguejos) coletados nas diferentes áreas do monitoramento. A amostragem da hemolinfa será realizada com seringa contendo anticoagulante diluído em solução fisiológica específica para a espécie alvo. A metodologia do vermelho neutro proposta no Anexo 1 do TR4 baseia-se na capacidade de retenção do vermelho neutro pelos lisossomos, analisado durante um intervalo de tempo. De acordo com o indicado no Anexo 1 do TR4, a análise consistirá de *“exame cuidadoso das células, com anotação das anormalidades estruturais, bem como o tempo de retenção do vermelho neutro. Para esta última observação, deverá ser estimada a proporção de células com “vazamento” lisossomal para o citosol, bem como as anormalidades no tamanho/cor dos lisossomos. Na avaliação temporal das lâminas, será utilizado o sinal “+” quando <50% das células apresentarem o citosol claro e ausência de anormalidades estruturais ou estresse; o sinal “±” quando entre 50 a 75%; e o sinal “-” quando >75%”*. Esta metodologia, classicamente empregada na Ecotoxicologia desde a década de 90, embora circunstanciada numa avaliação qualitativa, fornece informações claras sobre dano. No entanto, permite trabalhar com um número pequeno de amostras. Isto porque, para análise, a amostra tem um tempo de preparo (entre incubação e descanso) que perfaz no mínimo 45 min, e a análise em si, sob microscopia de luz, de cada amostra é realizada durante 2 h de observação. O ensaio deve ser realizado com amostras frescas, logo para apenas uma amostra seria necessário no mínimo cerca de 3 h de dedicação. Este tempo representa um esforço de pessoal de campo, depois da fase de amostragem, que não favorece o processamento do número de amostras proposto no Anexo 1 do TR4. Assim, propõe-se aqui readequar a análise do vermelho neutro para análise de retenção em microplaca (Ensaio com Vermelho Neutro adaptado de Babich & Boreunfreund, 1991), que permite o processamento de um número grande de amostras simultâneo, gerando um resultado quantitativo. Para esta metodologia a amostra da hemolinfa destinada ao ensaio com vermelho neutro será subdividida em duas alíquotas, uma será reservada para análise de proteínas para normalização do resultado final, e a outra será processada como descrito a seguir. As amostras serão centrifugadas para remoção da hemolinfa diluída em solução fisiológica da espécie e serão adicionados 200 µL de solução de Vermelho Neutro 40 µg/mL. As amostras serão incubadas por 3 h e depois centrifugadas. O sobrenadante será descartado e serão adicionados 200 µL de solução de formaldeído (0,5% v/v) em CaCl₂ (1%). Após 10 min de incubação, as amostras serão centrifugadas e o sobrenadante descartado. Nesta etapa, as amostras (células fixadas em formaldeído) serão congeladas (-20°C). As próximas etapas do protocolo serão realizadas em laboratório, onde após o retorno das amostras para temperatura ambiente, serão adicionados 100 µL de solução de álcool-ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico) para a extração do corante. As amostras serão sonicadas e a solução de álcool-ácido terá a absorbância analisada em leitura de microplaca (540 nm).

Para a avaliação do dano no material genético através do ensaio de micronúcleo serão utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As amostras serão coletadas com seringas (1 mL), munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos aos hemócitos. As amostras serão transferidas para tubos siliconizados, que serão dispostos em microcentrífuga (1.000 rpm, por 5 min), com retirada de 50 µL com micropipeta, colocada junto ao fundo do tubo. Este volume de material será gotejado na lateral da lâmina, sendo então espalhado por esfregaço com outra lâmina. O procedimento será realizado individualmente, com a obtenção de três lâminas/indivíduo, as quais serão secas ao ar e fixadas com solução de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético), por cerca de 20 min, com nova secagem à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão coradas com solução de Giemsa 2%, preparada em tampão fosfato pH 8,0 (Na₂HPO₄ + KH₂PO₄), também por 20 min. Após este procedimento, as lâminas serão lavadas com água deionizada, secas ao ar e com adesão de lamínulas com Entellan® (Merck). Posteriormente, as lâminas serão examinadas sob microscópio óptico comum, integrado a um sistema de análise de imagens por computador, com contagem das células micronucleadas pelo programa KS300® (Carl Zeiss, Alemanha) ou alternativamente o software livre ImageJ. As três lâminas de cada indivíduo serão avaliadas em aumento de 1.000X, com avaliação de 1.000 hemócitos em cada lâmina, sendo então quantificado o número de células micronucleadas por 1.000 células analisadas (MN‰).

Para avaliação do dano no material genético através do ensaio cometa poderão ser utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. Alíquotas das amostras serão misturadas a 100 μ L (0,5%) de agarose com baixo ponto de fusão, diluídas em tampão fosfato (342 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM K₂HPO₄) e 16 mM KCl (pH 7,6; 780 mOsmol/kg), que serão colocadas sobre lâminas previamente preenchidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobertas por lamínulas e mantidas sob refrigeração até atingirem estado sólido (5-7 min). Após este período, as lamínulas serão retiradas e colocadas em solução de lise gelada pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO, 1% TRITON X-100), por no mínimo 1 h. Após este período, as lâminas serão lavadas e mergulhadas em uma cuba com tampão alcalino de eletroforese pH>13 (10 M NaOH, 200 mM EDTA), para desnaturação do DNA (15 min). A eletroforese será realizada sob 1V/cm e 300mA (15 min), em gelo, com posterior lavagem das lâminas em tampão de neutralização pH 7 (0,4 M Tris), por igual tempo, com posterior fixação em etanol (10 min). Serão examinadas 100 células/lâmina, com duas lâminas/indivíduo, onde os “cometas” serão categorizados quanto à extensão da migração do DNA (variável qualitativa): (0) sem dano; (1) ligeiramente danificado; (2) moderadamente danificado; (3) muito danificado; e (4) dano máximo. Será também realizada a medição da “cauda” desses “cometas” (variável quantitativa), utilizando-se o programa computacional KS-300® (Carl Zeiss, Alemanha) ou alternativamente o software livre ImageJ, em um sistema de análise de imagens por computador acoplado a um microscópio Axiolab® (Carl Zeiss, Alemanha). A eletroforese permitirá avaliar os danos ao DNA, causados por processos biológicos como quebras de cadeia simples de DNA, lesões a sítios alcali-lábeis ou, ainda, reparo incompleto dos sítios de excisão. A variável qualitativa representará a proporção de extensão dos danos ao DNA nas quatro classes em análise, podendo ser confrontadas por uma análise de proporções multinomiais.

A avaliação de danos no material genético também poderá ser realizada por análise da indução de apoptose, através de técnica imunohistoquímica (brânquias ou fígado) ou de imunocitoquímica (sangue) dos peixes coletados durante o monitoramento, dependendo das condições de trabalho em campo. No caso de ser utilizada a técnica imunohistoquímica, cortes histológicos das amostras deverão ser reidratados e tratados com tripsina (1mg/mL em PBS 0,01 mol/L, pH 7,4) por 3 min (a 37°C). No caso de ser utilizada a técnica de imunocitoquímica, esta etapa de processamento da amostra não será necessária. Em ambos os casos, será realizada uma incubação com soro *goat* a 5% por 30 min, para que sejam evitadas ligações não específicas. As amostras serão então incubadas durante 16 h em câmara úmida com o anticorpo primário (anti-caspase), diluído em PBS-A 0,005% (tampão fosfato salino, 0,01mol/L, pH 7,4) a 4°C. As amostras serão novamente incubadas, porém agora com o anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories) por 1 h, para posterior amplificação com kit Vectastain ABC Elite (Vector Laboratories) em temperatura ambiente, por 30 min. A DAB (3,3'- diaminobenzidina, 1:300) será utilizada como substrato para a peroxidase. As amostras serão lavadas 5 vezes em PBS 0,01 mol/L, entre todos os passos descritos acima, exceto antes do anticorpo primário. Todo o procedimento será realizado a temperatura ambiente. Padronizações quanto à recuperação antigênica, concentração de anticorpos, e outros serão feitos caso a caso.

Danos morfológicos

Efeitos histopatológicos serão avaliados nas amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima. Fragmentos de fígado e brânquias serão imersos em paraformaldeído 4% ou solução de Bouin por até 24 h, a 4°C, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. O material será seccionado em micrótomo rotativo. As secções obtidas serão coradas com hematoxilina/eosina e tricômio de Mallory. Algumas lâminas serão submetidas à técnica de coloração PAS, sendo para isso banhadas em ácido periódico 1% por 10 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff por 20 min. Em seguida, será realizada uma nova lavagem em água corrente por 10 min, seguida de coloração com hematoxilina de Harris por 3 min, lavagens em água destilada, desidratação e montagem. Este material será utilizado para análises histopatológicas, onde serão avaliados: áreas de necrose, esteatose, gotículas lipídicas, colestatose, neoplasias, melanomacrófagos, alterações nucleares, congestão hemorrágica, infiltrados inflamatórios, fibrose e aneurisma lamelar. Considerando o reduzido número de amostras estabelecido originalmente no Anexo 1 do TR4 e posteriormente pela Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, recomenda-se que as análises de ecotoxicologia reprodutiva e de histopatologias gonadais em peixes sejam realizadas posteriormente, através de um planejamento amostral específico e adequado, caso os resultados das avaliações dos estudos populacionais em peixes detectem impactos negativos na reprodução das populações de peixes estudadas ao longo do programa de monitoramento em curso.

Biomarcadores de desregulação endócrina

Também serão realizadas análises de biomarcadores de desregulação endócrina: vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrp) em amostras de plasma sanguíneo dos peixes coletados durante o monitoramento. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, será utilizado um kit comercial de reagentes (Semi-Quantitative Biomarker ELISA Component Kit For Fish Samples, Cayman Chemical, Ann Harbour, MI, EUA), cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca. Considerando o reduzido número de amostras estabelecido originalmente no Anexo 1 do TR4 e posteriormente pela Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, recomenda-se que a determinação da razão sexual e da proporção de peixes intersexo nas amostras sejam realizadas posteriormente, através de um planejamento amostral específico e adequado, caso os resultados das avaliações dos estudos populacionais em peixes detectem impactos negativos na reprodução das populações de peixes estudadas ao longo do programa de monitoramento em curso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, 2013. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC no 42, de 29 de Agosto de 2013.

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

Babich H, Borenfreund E. 1991. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. Applied & Environmental Microbiology 57: 2101-2103.

Childress JJ, Somero GN. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. Marine Biology 52: 273-283.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Brasília, Brasil.

Covaci A, Koppen G. 2002. Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50–65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. Chemosphere 48: 827-832.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta 329: 23-38.

Faria FA, Silva-Costa A, Gianuca DM, Bugoni L. 2016. Cocol heron (*Ardea cocoi*) connects estuarine, coastal, limnetic and terrestrial environments: an assessment based on conventional dietary and stable isotope analysis. Estuaries and Coasts 39:1271-1281.

Henry RP, 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: Dodgson SJ, Tashian RE, Gros G, Carters ND (Eds.), The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. Plenum, New York, pp. 119-125.

McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythocuprein (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry 244: 6049-6055.

Nadella SR, Fitzpatrick JL, Franklin N, Bucking C, Smith S, Wood CM. 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. Comparative Biochemistry and Physiology C 149: 340-348.

Oakes KD, van Der Kraak GJ. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. Aquatic Toxicology 63: 447-463.

Péqueux A, Chapelle S. 1982. Na⁺-K⁺-ATPase activity and phospholipids in two euryhaline crabs related to changes in the environmental salinity. Marine Biology Letters 3: 43-52.

Ribeiro AC, Batista MT, Rodrigues Jr E, Oliveira MF, Vani SS, Rodrigues, Suda CNK. 2015. Atividades de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadoras de impacto ambiental. Revista Ambiente e Água 10: 793-803.

Santos-Neto EB, Azevedo-Silva CE, Bisi TL, Santos J, Meirelles AC, Carvalho VL, Azevedo AF, Guimarães JE, Lailson-Brito J. 2014. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. Science of the Total Environment 472: 194-203.

Tabatabai MA. 1974. A rapid method for determination of sulfate in water samples. Environmental Letters 7: 237-243.

Thuesen EV, McCullough KD, Childress JJ. 2005. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 85: 603-611.

USEPA, 1996. Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils. CD Rom, 3050B-2, Revision 2 December 1996. United States Environmental Protection Agency, USA.

USEPA, 2014. Method 8270D Semivolatile Organic Compounds By Gas Chromatography/Mass Spectrometry. SW-846 Update V, 8270D-71, Revision 5 July 2014. United States Environmental Protection Agency, USA.

Vajreswari A, Srinivasa Rao P, Kaplay SS, Tulpule PG. 1983. Erythrocyte membrane in rats fed high euristic acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, and (Na⁺,K⁺)- and (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPases. Biochemica Medica 29: 74-84.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Metiterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research 44: 69-84.

Voorspoels S, Covaci A, Schepens P. 2003. Polybrominated Diphenyl Ethers in marine species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: Levels, profiles, and distribution. Environmental Science & Technology 37: 4348-4357.

Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. 1996. Principles of Ecotoxicology. Londres: Taylor & Francis. 321 pp.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)

1. EQUIPE TÉCNICA – COORDENADORES DOS SUB-PROJETOS

Nome	Função	Instituição
Gilberto Barroso	Coordenação Geral Anexo	UFES
Alessandra Delazari Barroso	Coordenador de Sub-Projeto	FAESA
Anderson Geyson Alves de Araújo	Coordenador de Sub-Projeto	UFES
Björn Gücker	Coordenador de Sub-Projeto	UFSJ
Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna	Coordenador de Sub-Projeto	UFOP
Iola Gonçalves Boechat	Coordenador de Sub-Projeto	UFSJ
Valéria de Oliveira Fernandes	Coordenador de Sub-Projeto	UFES
Marco Aurélio Caiado	Coordenador de Sub-Projeto	IFES
Edmilson Costa Teixeira	Coordenador de Sub-Projeto	UFES
Daniel Rigo	Coordenador de Sub-Projeto	UFES

2. ESCOPO

Avaliação e Monitoramento biológico e da qualidade de água e sedimentos da área dulcícola referente ao Estado do Espírito Santo definida nos Anexos 2 e 3 do TR 4. O estudo de avaliação envolve a análise de integração da bacia hidrográfica com a região costeira e marinha englobando a análise de fluxos, bem como estudos hidrobiológicos (macrófitas aquáticas, fitoplâncton, zooplâncton e perifiton), hidroquímicos (material particulado em suspensão, nutrientes, metais, etc) e qualidade do sedimento.

Em função da sobreposição destes temas nos Anexos 2 e 3, foi enviado um documento à CTBio solicitando uma adequação da metodologia de coleta, frequência amostras e reposicionamento e otimização de estações ao longo do rio e lagos. Em reunião realizada em 18 de julho de 2018, a CTBio aprovou as seguintes modificações:

1. Nova estação amostral na calha do Rio Doce à jusante da UHE de Mascarenhas;
2. Reposicionamento das estações amostrais nos lagos Limão, Nova e Juparanã;
3. Inclusão de mais uma estação amostral na lagoa Monsarás (lagoa da planície costeira com influência marinha);
4. Amostragem hidroquímica em rios nas profundidades de subsuperfície e fundo em vez de subsuperfície, meio e fundo;
5. Amostragem hidroquímica e plâncton em meia profundidade nas lagos com menos de 3,0 m de profundidade;
6. Inclusão de uma amostragem anual de testemunho de sedimento em cada lago para análise de granulometria, matéria orgânica, carbono, nitrogênio, fósforo, elementos traço e marcadores moleculares para determinação da origem da matéria orgânica e, possivelmente, datação com isótopo;
7. Frequência amostral do fitoplâncton, zooplâncton, perifiton e macrófitas aquáticas mensal em vez de quinzenal;
8. Articulação com empresa de consultoria para amostragem de zoobentos, ictioplâncton e nécton que irá desenvolver o Anexo 2.

Desta maneira, as amostragens ao longo do rio e nos lagos totalizam 12 estações. As metas e descrição metodológica dos estudos a serem realizados seguem este documento, porém o número de estações a serem monitoradas e a frequência serão ainda adequadas seguindo o documento aprovado pela CTBio. Ao final deste Apêndice, está incluído o documento apresentado à CTBio.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)

PROJETO: COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA DULCÍCOLA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Alessandra Delazari Barroso (Doutor II)	Coordenador do projeto	FAESA
Mestre I	Auxílio nas análises qualitativas e quantitativas do fitoplâncton	UFES
Profissional júnior	Auxílio no processamento das análises qualitativa e quantitativa do fitoplâncton	UFES
Bolsista de IC	Auxílio nas análises das amostras e demais atividades no laboratório	FAESA
Bolsista de IC	Auxílio nas análises das amostras e demais atividades no laboratório	FAESA
Bolsista de IC	Auxílio nas análises das amostras e demais atividades no laboratório	FAESA

2. ESCOPO

O monitoramento da qualidade da água do rio Doce e ambientes lacustres adjacentes, com base na ecofisiologia do fitoplâncton lacustre em 10 estações amostrais do Anexo 3 'Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)' nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce, constante no Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, em um período de 12 meses. Os dados brutos e produtos esperados contemplam o inventário de espécies e sua variação espaço-temporal, bem como 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 e ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 4: Monitoramento ambiental da área dulcícola em 10 estações ao longo da bacia do Rio Doce: Fitoplâncton dulcícola

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, pode 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

<p>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></p>	<p>RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i></p>
<p>Densidade e biomassa do fitoplâncton dulcícola Riqueza de espécies Diversidade de Shanon & Wiener, Equitabilidade de Pielou Dominância de Simpson Cianobactérias potencialmente tóxicas</p>	<p>Prof. Dr. Alessandra Delazari-Barroso</p>
<p>5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i></p>	<p>RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i></p>
<p>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 <i>a</i>. Análise do potencial de produção de toxinas por cianobactérias e relação com a saúde pública.</p>	<p>Prof. Dr. Alessandra Delazari-Barroso</p>

6. METODOLOGIA

As amostras da comunidade fitoplanctônica serão coletadas mensalmente, em um período de 12 meses, em 10 estações de amostragem ao longo do Rio Doce (região do estado do Espírito Santo).

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 4% - adicionar 10 mL; o outro frasco deverá ser mantido sem preservante, em caixa térmica com gelo permanente, para análise do material vivo em laboratório (não congelar). As espécies serão analisadas em microscópio óptico Olympus CX41, equipado com ocular micrometrada e câmara clara. A identificação será realizada ao menor nível taxonômico possível usando bibliografias específicas.

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, que, aliada aos dados de perfilagem físicos, químicos e físico-químicos, determinados no subprojeto da Meta 1 dessa proposta, podem definir o padrão de funcionamento lacustre e fornecer respostas acerca da produtividade e sucessão de espécies relacionadas às mudanças ambientais espaço-temporais no sistema lacustre do Baixo Rio Doce.

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. A densidade do fitoplâncton deverá ser estimada pelo método de Utermohl, em microscópio invertido Nikon Ts-100F 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 de 10 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 fitoplancônica 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 no subprojeto da Meta 1 dessa proposta. 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, K. & Economou-Amilli, A. 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, M. *et al.* Plankton community as an indicator of water quality in tropical shrimp culture ponds. *Marine Pollution Bulletin*, v.56, p. 1343-1352, 2008.
- HYENSTRAND, P.; RYDIN, E. & GUNNERHED, M. Response of pelagic cyanobacteria to iron additions - enclosure experiments from Lake Erken. *Journal of Plankton Research* 22 (6): 1113-1126. 2000.
- Lund, J.W.G.; Kipling, C.; Le Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiology*, v.11, p.143-170.
- MARGALEF, R. 1983. *Limnologia*. Barcelona: Omega.
- Pielou, E. C. *Ecological diversity*. New York: Wiley, 1975.
- Sant'anna C.L.; Werner, T.P.; Dogo, V.R.; Rios, C.R. and Carvalho, F.R. de 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, 126:251-265,.
- Shannon, C. E. & Weaver, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Simpson, E. H. 1949. *Measurement of diversity*. Nature 163: 688.
- Vuori, K.-M. Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. *Annales Zoologici Fennici* 32: 317-329. 1995.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)

PROJETO: COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA DULCÍCOLA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna	Coordenadora	UFOP
Davi Silva	Apoio técnico - Doutorado	UFOP
Edissa Silva	Apoio técnico – Médio	UFOP
Pós- Doutor	Análise de Dados	UFOP
Bolsista IC (3)	Análise de Amostras	UFOP

2. ESCOPO

Em novembro de 2015 o rompimento da barragem de Fundão despejou na bacia do Rio Doce aproximadamente 32 milhões de m³ de rejeito de mineração de ferro. A lama de rejeitos percorreu cerca de 680 km ao longo dos rios Gualaxo, Carmo e Doce, até desaguar no Oceano Atlântico na porção do Estado do Espírito Santo (ES) (MMA & ICMBIO, 2017). As águas dos rios, dos seus afluentes e das lagoas adjacentes - bem como a área marítima atingida - tiveram a qualidade afetada, resultante da entrada do rejeito na matriz aquática (Lopes, 2016).

A comunidade zooplanctônica é utilizada como bioindicadora de impactos na matriz aquática (Amsinck Et Al., 2007; Jeppesen Et Al., 2011; Sodré et al., 2015). Nos ecossistemas aquáticos, as alterações na composição das espécies de organismos de reprodução rápida como os organismos zooplanctônicos é a reação mais sensível às drásticas alterações da matriz aquática (Schindler, 1987). Isso ocorre porque o zooplâncton, além de possuir um tamanho corporal pequeno (dimensão linear máxima inferior a 1 mm), apresenta ciclo de vida curto, respondendo de maneira rápida às ações antrópicas, incluindo alterações na estrutura da população e da comunidade (Attayde & Bozelli, 2011).

Alguns aspectos universais das comunidades aquáticas têm sido considerados como preditores de impactos ambientais: composição, distribuição quantitativa das espécies, diversidade, tamanho e biomassa. Mais recentemente, a incorporação da análise funcional tem sido considerada uma ferramenta preditiva robusta para a avaliação de impactos ambientais. Dentre os vários componentes da diversidade biológica, a diversidade funcional pode ser considerada como uma abordagem que transcende os conceitos tradicionais associados às comunidades, pois congrega de forma clara os vários modos como os organismos respondem à variabilidade ambiental (Gerisch et al., 2012).

3. OBJETIVO

O presente projeto tem como principal objetivo verificar a composição de espécies, riqueza, diversidade e biomassa da comunidade zooplanctônica em 10 estações amostrais do Anexo 3 'Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)' nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce, constante no Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. Para avaliar se a comunidade zooplanctônica mantém ativo seu padrão de recrutamento (ingresso de novos indivíduos), o número de fêmeas ovadas e de embriões também serão mensurados como um indicativo do *fitness* populacional.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 - Monitoramento da Comunidade Zooplanctônica nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce (ES)

Coleta de amostras da comunidade zooplanctônica das lagoas dulcícolas do Baixo do Rio Doce, em pontos amostrais representativos da área afetada dos ecossistemas fluvial, lacustres e estuarino.

Meta 2 - Avaliação da estrutura da comunidade zooplanctônica nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce

A partir das análises das amostras serão relacionadas as espécies zooplanctônicas, o aspecto quantitativo da comunidade (abundância relativa e densidade de organismos) e a diversidade de espécies da comunidade.

Meta 3 - Biomassa da comunidade zooplânctônica nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce

Determinação da biomassa (ug.peso seco. m⁻³) das principais espécies zooplânctônicas como elemento de análise da contribuição da comunidade para o fluxo de energia e categorização das categorias de tamanho do zooplâncton.

Meta 4 - Avaliação do *fitness* da comunidade zooplânctônica nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce

Avaliação da presença de fêmeas ovadas, larvas e formas imaturas como descritores do ingresso de novos indivíduos para a comunidade zooplânctônica.

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>
Comunidade zooplânctônica dulcícola <ul style="list-style-type: none"> - Composição de espécies - Densidade (organismos/m³) e Abundância relativa das espécies (%) - Riqueza, Uniformidade e Diversidade de espécies com o uso de Índice de Shannon - Biomassa (ug.Peso Seco.m³) e categorias de tamanho do zooplâncton - Indicadores do ingresso de novos indivíduos para a comunidade zooplânctônica (<i>fitness</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Profa. Dra. Eneida M. Eskinazi Sant'Anna - Bolsista Pós-Doutorado - Bolsista Apoio Técnico - Bolsista IC

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>Análise espaço-temporal da composição de espécies zooplânctônicas e da distribuição quantitativa das comunidades (espécies dominantes, espécies raras, categorias funcionais dominantes - micro, meso ou macrozooplâncton);</p> <p>Avaliação da diversidade de espécies considerando o grau de uniformidade da comunidade, riqueza e diversidade de espécies através de índices quantitativos</p> <p>Análise da biomassa zooplânctônica em função das espécies dominantes e categorias de tamanho predominantes, considerando a integração de dados com outros ecossistemas aquáticos continentais similares</p> <p>Investigação dos indicadores que sugerem o recrutamento de indivíduos na comunidade zooplânctônica através da presença de fêmeas ovadas e formas jovens, como parâmetro indicador da qualidade do habitat dulcícola.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Profa. Dra. Eneida M. Eskinazi Sant'Anna - Bolsista Pós-Doutorado - Bolsista Apoio Técnico com Doutorado e Médio - Bolsista IC

6. METODOLOGIA

Amostras de zooplâncton serão coletadas em 10 estações amostrais nos ecossistemas aquáticos do Baixo Rio Doce. Para obtenção das amostras será inicialmente determinada a profundidade máxima local e a extensão da zona fótica. As amostras verticais serão coletadas em profundidades distintas desde o

epilimnio até o hipolimnio, com garrafa tipo Van Dorn. Para cada amostra serão obtidos 100 litros de água, posteriormente filtradas em rede de plâncton de 45 µm de abertura de malha. Antes da fixação com formol açucarado e neutralizado na concentração de 4%, os organismos serão anestesiados com adição de água tônica nas amostras (5ml), para evitar a contração de espécimes. (Bicudo & Bicudo, 2007).

Para a análise quantitativa do zooplâncton, toda a amostra será examinada. Para o microzooplâncton (rotíferos), subamostras de 1ml serão analisadas em câmara de Sedgwick-Rafter em microscópio óptico equipado com ocular milimetrada. Para análise do mesozoplâncton (copépodos e cladóceros) toda a amostra será examinada em estereomicroscópio, com subamostras de 5ml tomadas da amostra total. Serão obtidas imagens dos espécimes para a tomada de medidas morfométricas posteriores e análise taxonômica. Os espécimes triados serão catalogados e mantidos na coleção do Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Ouro Preto.

As espécies zooplanctônicas serão reunidas em categorias de constância de ocorrência, onde a espécie constante será aquela que possuir evidência em mais de 50% das amostras; a espécie acessória será a que estará presente em 25 a 50% das amostras; e a espécie acidental, em menos de 25% das amostras (MALABARBA et al., 2004). Serão obtidos dados da densidade (org/m³), riqueza e diversidade (H'), o tamanho corporal, bem como a proporção de fêmeas ovadas e número de embriões presentes na amostra para a estimativa de recrutamento.

A equitabilidade será expressa pelo *Índice de Pielou*:

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

Em que "H'máximo" representa a diversidade máxima possível que pode ser observada se todas as espécies apresentarem igual abundância :: H' máximo = log S (número total de espécies). A diversidade será expressa através da função entre o número de espécies e a equitabilidade dos valores de importância da mesma. Para tanto, será utilizado o índice de Shannon – Wiener (1949).

$$H' = - \sum p_i (\log p_i)$$

A biomassa zooplanctônica 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:

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

Onde c = ln a e "a" e "b" são coeficientes específicos para cada espécie zooplanctônica (Bicudo & Bicudo, 2007).

Modelos de variância (ANOVA, MANOVA) serão utilizados de acordo com o teste de normalidade dos dados. Modelos gerais lineares (GLM ou GLLM) e de mínimos quadrados serão utilizados para avaliar a relação da característica limnológica dos sistemas estudados (parâmetros limnológicos obtidos no sub-Projeto de caracterização limnológica dos ecossistemas aquático do Baixo Rio Doce) e indicadores contínuos e categóricos da comunidade zooplanctônica. A análise Canônica é uma técnica multivariada usualmente utilizada para constatar a associação entre o conjunto de variáveis (concentração de partículas orgânicas e inorgânicas) com outras variáveis (diversidade, abundância, riqueza e biomassa dos organismos zooplanctônicos

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*. p.135-157.
- Attayde, J. L. & Bozelli, R. L. (2011). 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.
- Bicudo, C. E M. & Bicudo, D. C. (2007). *Amostragem em Limnologia*. Cap 9: Métodos de coleta, preservação, contagem e determinação de biomassa em zooplâncton de águas epicontinentais. 2ª ed. São Carlos, SP.

Jeppesen, E.; Nøges, P.; Davidson, T. A.; Haberman, J.; Nøges, T.; Blank, K.; Lauridsen, T. L.; Søndergaard, M.; Sayer, C.; Laugaste, R.; Johansson, L. S.; Bjerring, R. & Amsinck, S. L. (2011).- 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.

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

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

Schindler, D.W. (1987). Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* V. 44.

Sodré E.O., Lopes, P.M. Figueiredo-Barros, MP., Roland, F., Esteves, FA., Bozelli, R. 2015. The effects of mining tailings and flood pulse on zooplankton in an Amazonian floodplain environment (Batata Lake, Pará, Brazil). *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi. Cienc. Nat.*, 20: 247-259.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)

PROJETO: COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Anderson Alves Araújo	Coordenador	UFES/CEUNES
Tainã de Souza	Pesquisador (Mestre II)	UFES/CEUNES
Renara Nichio Amaral	Técnico Nível Superior	UFES/CEUNES
Victor Miranda Santos	Técnico Nível Médio	UFES/CEUNES
Fabrcia Souza dos Santos	Técnico Nível Médio	UFES/CEUNES

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). E, segundo Irgang *et al.* (1984), as 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.

Devido às suas adaptações, as macrófitas são consideradas excelentes bioindicadores da qualidade de água e em conjunto com estudos florístico-taxonômicos, atuam como elementos importante para caracterização dos sistemas aquáticos continentais (Junior 2003; Lima *et al.* 2013). Independentemente da diversidade filogenética e taxonômica, as macrófitas apresentam classificação ecológica ou forma biológica que refletem sua adaptação ao meio aquático (Alves *et al.* 2011) e são, em sua grande maioria, angiospermas, porém outros grupos de organismos podem ser enquadrados como macrófitas, dentre eles: macroalgas, plantas avasculares e vasculares sem sementes (Junior 2003).

Dentro de um ecossistema aquático natural e equilibrado, as macrófitas e outras plantas aquáticas oferecem um importante habitat para diversos tipos de animais, dentre eles: aves aquáticas, invertebrados e peixes. Essa vegetação apresenta formas submersas, emergentes ou flutuantes e é encontrada nas margens de lagos e em toda zona eufótica (Muhammetog̃lu & Soyupak 2000). Além disso, elas desempenham um importante papel na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, especialmente na indicação da vulnerabilidade ambiental tendo em vista que essas plantas respondem, positiva- ou negativamente, a diferentes gradientes ambientais (Esteves, 1998)

Atuantes como bioindicadores, a variação da composição das assembleias de macrófitas aquáticas pode determinar, por sua vez, os padrões de diversidade de outras assembleias biológicas. A presença, quantidade e distribuição de determinadas espécies podem indicar a magnitude de alguns impactos ambientais em um ecossistema aquático (Kovács 1992; Callisto & Gonçalves 2002; Callisto *et al.* 2005). Para tanto, dentre os principais métodos utilizados para verificação do efeito bioindicador estão o levantamento de espécies, a avaliação das modificações na riqueza e os índices de diversidade; abundância de organismos resistentes; perda de espécies sensíveis; medidas de produtividade primária e secundária; sensibilidade a concentrações de substâncias tóxicas (ensaios ecotoxicológicos) (Barbour *et al.* 1999).

Dada a relevância ecológica e fisionômica, e em decorrência do rompimento da barragem de Fundão, pertencente à Samarco, localizada no complexo minerário de Germano, em Mariana-MG (ocorrido em 05/11/2015, conforme item I da Cláusula 01), a presente proposta tem por objetivo determinar e monitorar a biodiversidade de macrófitas aquáticas da região da Bacia do Rio Doce que foi diretamente afetada.

3. OBJETIVO

1. Identificar taxonomicamente a riqueza e composição das espécies de macrófitas aquáticas (Plantas Vasculares sem Sementes e Angiospermas);
2. Identificar a distribuição geográfica e elaborar mapas georreferenciados das espécies ocorrentes na Bacia do Rio Doce;

3. Elaborar guia(s) fotográfico(s) para identificação das espécies em seu hábitat.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 4: Monitoramento ambiental da área dulcícola em 10 estações ao longo da bacia do Rio Doce:
Caracterização de da comunidade de macrófitas aquáticas

Submeta 1 - Coleta de Dados

Realizar expedições de coleta mensais por um período de doze meses, a partir do início da execução da proposta, nas áreas pré-estabelecidas ao longo do curso do Rio Doce no estado do Espírito Santo.

Justificativa - Coleta de material botânico para elaboração de uma lista de espécies, a partir da determinação da riqueza e composição estimadas das espécies nas áreas amostradas.

Submeta 2 - Análise de Dados

Comparar os componentes da diversidade (riqueza, abundância e composição), entre as áreas afetadas e não afetadas e ao longo do tempo de recuperação.

Justificativa - Monitoramento das mudanças das comunidades em resposta às possíveis modificações abióticas decorrentes da recuperação das características originais do rio.

Submeta 3 - Distribuição espacial

Diagnosticar habitats preferenciais das espécies e indicar possíveis endemismos até o final do projeto.

Justificativa - Análises dessa natureza são utilizadas para determinação de possíveis áreas de proteção baseadas nas informações de distribuição geográfica ou especificidade ambiental.

Submeta 4 - Guias Fotográficos

Montar um banco de imagens das espécies em seu ambiente natural.

Justificativa - Imagens das características diagnósticas que melhor se apliquem à identificação específica são de extrema relevância para elaboração de diagnósticos ambientais rápidos.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS	RESPONSÁVEL
Riqueza e composição de espécies de macrófitas Similaridade florística Espécies indicadoras (Exóticas/Endêmicas/Ameaçadas)	Anderson Alves Araújo

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL
Identificação dos grupos de plantas macrófitas vasculares sem sementes e angiospermas coletados na foz do Rio Doce e regiões adjacentes (mensal). Comparação da composição florística com outras áreas de semelhantes condições abióticas para verificação da similaridade entre áreas. Discussão sobre espécies indicadoras e qualidade de ambiente.	Anderson Alves Araújo

6. METODOLOGIA

Coleta de material botânico - Riqueza, Composição, Distribuição

As expedições de coleta para macrófitas aquáticas (Plantas Vasculares sem sementes e Angiospermas) serão feitas mensalmente (ao longo de 12 meses). Para amostragem, as plantas deverão ser coletadas conforme estabelecido no Anexo 3, utilizando um quadrado de 0,5 m² que deverão ser lançados três vezes aleatoriamente em cada um dos pontos dentro da malha amostral. Para cada ponto

amostral serão medidas a distância das margens, a transparência e a profundidade da água com fita métrica, disco de Secchi e corda graduada, respectivamente.

Os espécimes férteis (frondes para plantas vasculares sem sementes, flores e/ou frutos para as Angiospermas) devem ser coletados com no mínimo de três amostras e serem processados de acordo com os métodos usuais em taxonomia vegetal (Bridson & Forman 1998). As amostras deverão ser encaminhadas para o Laboratório de Sistemática e Genética Vegetal/PPGBT/CEUNES/UFES para posterior envio para a coleção biológica que as receberá - Herbário VIES (Universidade Federal do Espírito Santo). Sempre que possível, amostras adicionais deverão ser 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 deve necessariamente ser coletada em álcool 70% (além das três amostras para exsiccatas).

Os representantes da flora serão acompanhados de seus respectivos registros fotográficos e os dados referentes às coordenadas geográficas serão obtidos por meio do aparelho de GPS (Global Positioning System).

As espécies serão identificadas por meio do método comparativo de vouchers e tipos nomenclaturais, depositados nos principais herbários estaduais (BHCB, CVRD, MBML, VIC, VIES), nacionais (RB, SPF) e internacionais (K, MO, NY), acrônimos de acordo com Thiers (2016), além da utilização das bibliografias específicas.

Para a classificação das formas biológicas das macrófitas aquáticas será seguido o proposto por Irgang et al. (1984), sendo as espécies categorizadas como: Submersa fixa - enraizadas e 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; e Anfíbia - plantas geralmente de margens; emergentes - enraizadas com folhas emergindo parcialmente.

7. REFERÊNCIAS

- Alves, J.A.A.; Tavares, A.S.; Trevisan, R. 2011. Composição e distribuição de macrófitas aquáticas na lagoa da Restinga do Massiambu, Área de Proteção Ambiental Entorno Costeiro, SC. *Rodriguésia* Vol. 62. 4: 785-801.
- Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Snyder, B.D.; ST RIBLING, J.B. 1999. *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*. 2. ed. Washington, D.C.: Environmental Protection Agency; Office of Water. (EPA 841-B-99-002).
- Bridson, D. & Forman, L.1998. *The Herbarium Handbook*. Richmond: Royal Botanical Garden, Lubrecht & Cramer Ltd. 348p.
- Callisto, M. & Gonçalves, J.F.Jr. 2002. A vida nas águas das montanhas. *Ciência Hoje*, Vol. 31. 182: 68-71.
- Callisto, M., Gonçalves Jr., J.F.; Moreno, P. 2005. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. In: Goulart, E.M.A. (Org.) *Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais: Proj. Manuelzão*. Belo Horizonte: Coopmed. Pp. 555-567.
- Cook, C.D.K.; Gut, B.J.; Rix, E.M.; Scheneller, J.; Seitz, M. 1974. *Water plants of the world*. The Hague: Junk Publishers. 568p.
- Esteves, F.A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. 2. ed. Rio de Janeiro-RJ: Ed. Interciência, 602p.
- Irgang, B.E.; Pedralli, G.; Waechter, J.I. 1984. Macrófitas aquáticas da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. *Roessleria, Porto Alegre* Vol. 6: 395-404.
- Junior, I.B. 2003. 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 p.
- Kovács, M. (Ed.). 1992. *Biological Indicators in Environmental Protection*. Tradução de Á. Máthé, Z. Tuba, J. L. Meenks, Zs. Csintalan. Chichester: Ellis Horwood. 125p.

- Lima, E.A.; Machado-Filho, H.O.; Melo, J.I.M. 2013. Angiospermas aquáticas da Área de Proteção Ambiental (APA) do Cariri, Paraíba, Brasil. *Rodriguésia* Vol. 64. 4: 667-683.
- Muhammetog̃lu, A. & Soyupak, S. 2000. A three-dimensional water quality-macrophyte interaction model for shallow lakes. *Ecological Modelling* Vol. 133: 161-180.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 549p.
- Thiers, B. 2016 [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 novembro 2016.
- Westlake, D.F. 1975. Macrophytes. *In*: Whitton, B.A. (ed.). *River ecology*. University of California Press, Berkeley. Pp. 106-128.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)

PROJETO: CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE PERIFÍTICA FLUVIAL E LACUSTRE DO BAIXO RIO DOCE, ESPÍRITO SANTO

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Valéria de Oliveira Fernandes	Coordenadora de sub-projeto	UFES
Stéfano Zorzal de Almeida	Pós-doutorando/co-coordenador de sub-projeto	UFES
Mestre II/Profissional Pleno	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES

2. ESCOPO

O presente projeto propõe a análise de material perifítico em termos de composição, estrutura e biomassa da comunidade algal, visando à avaliação de sua variação espaço temporal nas 10 estações amostrais do Anexo 3 'Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)' nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce, constante no Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. Espera-se, assim, descrever um ciclo sazonal anual da variação da comunidade como base para a aplicação de métodos interdisciplinares de avaliação da qualidade ecológica, sendo complementar a outras áreas do conhecimento.

3. OBJETIVO

O presente projeto tem como objetivo geral descrever e monitorar a comunidade de algas perifíticas do Baixo Rio Doce, na região do Espírito Santo, após o rompimento da barragem de minério de Mariana. Para tal, os objetivos específicos são: i) descrever a flora de algas perifíticas; ii) avaliar a variação espacial e temporal da abundância das espécies e da biomassa perifítica; iii) avaliar a qualidade ecológica do Baixo Rio Doce e de lagoas adjacentes a partir de espécies indicadoras da comunidade perifítica.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 - Avaliação da qualidade ecológica do Baixo Rio Doce utilizando a comunidade perifítica

O perifíton é definido como uma complexa comunidade de microrganismos (algas, bactérias, fungos, protozoários, microcrustáceos), detritos orgânicos e inorgânicos aderidos ou associados a substratos naturais ou artificiais, vivos ou mortos (Wetzel, 1983). Uma vez que as comunidades perifíticas são compostas principalmente por algas (95 a 99% desta comunidade - Wetzel, 1990; Fernandes, 1997), elas podem ser importantes produtores primários em diversos ecossistemas aquáticos (representando até 85% da produção primária total), possuindo um reconhecido papel nos ciclos energéticos e de nutrientes, além de servirem de habitat e refúgio contra predadores para diversos organismos (Stevenson, 1996; Biggs & Kilroy, 2000).

A importância do perifíton vai além do funcionamento dos ecossistemas aquáticos, podendo ser utilizado como uma importante ferramenta de monitoramento da qualidade das águas. Dentre as características que fazem com que a comunidade seja boa bioindicadora de qualidade 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 um 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 que deve ser

incluída na avaliação dos impactos dos rejeitos de minério de ferro, decorrentes do colapso da barragem de rejeitos de Fundão (Mariana, MG), no sistema lacustre e fluvial do baixo Rio Doce.

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>
Lista de táxons de algas perifíticas; Abundância de espécies perifíticas; Concentração de clorofila-a do perifíton; Peso seco e peso seco livres de cinzas do perifíton	Valéria de Oliveira Fernandes Stéfano Zorzal de Almeida

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º 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 lagoas adjacentes; Análise das possíveis espécies indicadoras de degradação ambiental.	Valéria de Oliveira Fernandes Stéfano Zorzal de Almeida

6. METODOLOGIA

Desenho amostral

As amostras da comunidade perifítica serão coletadas mensalmente, durante 12 meses, em 10 estações de amostragem ao longo do Baixo Rio Doce, na região do estado do Espírito Santo. Em cada uma das estações amostrais localizadas em ambientes lóticos, serão coletadas três regiões, sendo uma em cada margem e outra na região da calha do rio. A comunidade perifítica somente será coletada na região da calha do rio se nela houver substrato consolidado (i.e., seixos ou macrófitas). Nas estações amostrais de ambientes lênticos, a comunidade perifítica será coletada na margem mais próxima à estação amostral, uma vez que esta comunidade não se desenvolve na região pelágica de ambientes mais profundos (onde foram estabelecidas as estações amostrais do presente estudo).

Coleta e análise (estrutura e biomassa) da comunidade perifítica

Em cada uma das estações amostrais (e regiões das estações, no caso dos rios) serão coletadas, no mínimo, três unidades de um tipo substrato (a quantidade de substratos coletados deverá conter uma quantidade de material suficiente para os procedimentos analíticos). O tipo de substrato escolhido deverá ser comum às estações amostrais. Contudo, existe uma 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 (enraizados), 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 perifíton 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 a análise qualitativa, quantitativa, de peso seco, e biomassa fotossintetizante.

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). Esta 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 sete campos analisados) e pelo menos 400 indivíduos devem ser contados por amostras (Ferragut *et al.* 2013).

O peso seco e o peso seco livre de cinzas 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).

Justificativa de Alteração dos itens do TR

Substratos: devido à distribuição espacial dos substratos ao longo das estações amostrais não serem constantes ao longo de um rio (Vannote *et al.*, 1980), foi sugerido uma ordem de escolha de substrato de acordo com a presença deles. Dessa forma, sempre que possível será coletado seixos (rochas) que serão o substrato padrão. Mas na ausência destes, serão coletados outros substratos de acordo com a ordem apresentada.

Fixação das amostras: a fixação das amostras com a solução de Transeau não tem sido a mais utilizada nos estudos da comunidade perifítica, e, portanto, foi sugerida a alteração para a solução formalina 4% (Bicudo & Menezes, 2005; Almeida & Fernandes, 2012; 2013).

Extração da clorofila-a: a alteração do método de extração da clorofila-a utilizando acetona para o método do etanol a quente é justificada pela toxicidade da acetona. Durante o processo, há a necessidade de maceração do material biológico com a acetona, aumentando o risco de contaminação. O método de extração por etanol, por outro lado, além de não ser tóxico (por inalação), não há tanta manipulação do material, diminuindo os riscos. Este método de extração vem sendo utilizado com sucesso em diversos trabalhos sobre a comunidade algal, inclusive com a comunidade perifítica (Santos *et al.*, 2013; Casartelli & Ferragut, 2015).

Peso seco e peso seco livre de cinzas: quanto à inclusão da análise do peso seco e do peso seco livre de cinzas se justifica pela análise da representatividade de material orgânico (proveniente no perifiton principalmente de algas) e do material inorgânico, que pode ter proveniência do rejeito da barragem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Algarte, V.M., Dunck, B., Leandrini, J.A. & Rodrigues, L. 2016. Periphytic diatom ecological guilds in floodplain: Ten years after dam. *Ecological Indicators*, 69: 407-414.

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

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

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

- Battarbee, R. W.; Jones, V.; Flower, R. J.; Cameron, N.; Bennion, H.; Carvalho, L. & Juggins, S. 2001. Diatoms. In: Smol, J. P.; Birks, H. J. B.; Last, W. M. (ed.). *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*. London: Kluwer Academic Publishers.v.3. p. 155-203.
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., May, T.W. et al. 2007. Biomonitoring of Lead, Zinc, and Cadmium in Streams Draining Lead-Mining and Non-Mining Areas, Southeast Missouri, USA. *Environmental Monitoring and Assessment* 129: 227.
- Bicudo, C.E.M.; Menezes, M. 2005. Gêneros de Algas continentais do Brasil (Chave para identificação e descrições). São Carlos, Ed. Rima.
- Biggs, B.J.F. & Kilroy, C. 2000. *Stream periphyton monitoring manual*. New Zeland, Niwa.
- Camargo, V.M. & Ferragut, C. 2014. Estrutura da comunidade de algas perifíticas em *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult (Cyperaceae) em reservatório tropical raso, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea*, 41: Casartelli, M.R. & Ferragut, C. 2015. Influence of seasonality and rooted aquatic macrophytes periphytic algal community on artificial substratum in a shallow tropical reservoir. *International Review of Hydrobiology*, 100: 1-11.
- Carapunarla, L., Baumgartner, D. & Rodrigues, L. 2014. Community structure of periphytic algae in a floodplain lake: a long term study. *Acta Scientiarum: Biological Science*, 36: 147-154.
- DeNicola, D.M. & Lellock, A.J. 2015. Nutrient limitation of algal periphyton in streams along an acid mine drainage gradient. *Journal of Phycology*, 51: 739–749.
- Dunk, B., Scheneck, F. & Rodrigues, L. 2015. Patterns in species and functional dissimilarity: insights from periphytic algae in subtropical floodplain lakes. *Hydrobiologia*. DOI 10.1007/s10750-015-2379-x.
- Fernandes, V.O. Variação temporal da estrutura e dinâmica da comunidade perifítica em dois tipos de substrato na Lagoa Imboassica, Macaé (RJ). 1997. 198 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.
- Ferragut, C., Bicudo, D.C. & Vercellino, I.S. 2013. Amostragem e medidas de estrutura da comunidade perifítica. In: A. Schwarzbold, A. Burliga & L.C. Torgan (eds.). *Ecologia do perifíton*. Rima, São Carlos, 157-177 pp.
- Gaiser, E.E., Childers, D.L., Jones, R.D., Richards, J.H., Scinto, L.J. & Trexler, J.C. Periphyton responses to eutrophication in the Florida Everglades: Cross-system patterns of structural and compositional change. *Limnology and Oceanography*, 51: 617-630.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S. & Ohnstad, M. A. M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. 2a ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications. International Biological Program.
- Hill, B.H., Willingham, W.T., Parrish, L.P. et al. 2000. Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia* 428: 161.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & Le-Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170.
- McCauley, J.R. & Bouldin, J.L. 2016. Cadmium Accumulation in Periphyton from an Abandoned Mining District in the Buffalo National River, Arkansas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96: 757.
- Murakami, E.A., Bicudo, D.C. & Rodrigues, L. 2009. Periphytic algae of the Garças Lake, Upper Paraná River floodplain: comparing the years 1994 and 2004. *Brazilian Journal of Biology*, 69: 459-468.
- Santos, T.R., Ferragut, C. & Bicudo, C.E.M. 2013. Does macrophyte architecture influence periphyton? Relationships among *Utricularia foliosa*, periphyton assemblage structure and its nutrient (C, N, P) status. *Hydrobiologia*, 714: 71-83.

- Sartory, D.P. & Grobbelaar, J.E. 1984. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, 114:177-187.
- 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. 1996. p. 3-30.
- Uehlinger, V. 1964. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences* 17: 121-123.
- Utermohl, H. 1958. Zur Vervollkomnung der quantitative phytoplankton: metodik. Internationale Vereinigung *Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-38.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R. & Cushing, C.E. 1980. The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 27: 130-137.
- Wetzel, R.G. 1990. Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 24:6-24.
- Wetzel, R.G. 1983. Opening remarks. In: Wetzel, R.G. (Ed.). *Periphyton of freshwater ecosystems*. The Hague, Dr. W. Junk Publishers, p. 339-346.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)

PROJETO: CARACTERIZAÇÃO LIMNOLÓGICA DE LIPÍDEOS TOTAIS, ÁCIDOS GRAXOS E DAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS DE C, N E SUAS RAZÕES ISOTÓPICAS NO SESTON E SEDIMENTOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Profa. Iola Gonçalves Boëchat	Coordenador de subprojeto	UFSJ
Prof. Björn Gücker	Coordenador de subprojeto	UFSJ
Dr. Ricky Cássio dos Santos Silva	Pesquisador nível doutorado	UFSJ
Elisa Mercês Soares	Pesquisadora nível mestrado	UFSJ
Técnico a definir	Técnico nível médio	UFSJ

2. ESCOPO

A caracterização limnológica dos ecossistemas fluvial, lacustres e estuarino do Baixo Rio Doce visa descrever as condições físicas, hidroquímicas e hidrobiológicas nas 10 estações amostrais do Anexo 3 'Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)'. O monitoramento será realizado através de amostragens mensais em 10 estações durante um período de 12 meses para o monitoramento de lipídeos totais, ácidos graxos e das concentrações totais de C, N e suas razões isotópicas no seston e sedimentos. Os dados brutos e produtos esperados contemplam a variação espaço-temporal, bem como a avaliação da relação da qualidade da água, como descritos nos itens a seguir.

3. OBJETIVO

Avaliação e monitoramento biológico e da qualidade de água e sedimentos da área dulcícola/estuarina definida no Anexo 3 do TR 4. O estudo de avaliação envolve a análise dos ecossistemas aquáticos dulcícolas da calha do Rio Doce e nos lagos do Limão, Nova, Juparanã, Areal, Areão e Monsarás, além da porção estuarina da calha do Rio Doce. O monitoramento se refere ao acompanhamento de lipídeos totais, ácidos graxos e das concentrações totais de C, N e suas razões isotópicas no seston e sedimentos por meio de amostragem em campo com coleta de amostras, análises laboratoriais e análise e discussão de dados de ambientes aquático continental e estuarino em periodicidades amostrais mensal.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 4: Monitoramento ambiental da área dulcícola em 10 estações na região do Baixo Rio Doce: Análise de lipídeos totais, ácidos graxos e das concentrações totais de C, N e suas razões isotópicas no seston e sedimentos

A ação antrópica sobre ecossistemas de água doce se faz perceber em todos os aspectos da saúde destes ecossistemas, seja através de modificações na qualidade da água, na diversidade estrutural de micro- e macrohabitats ou diretamente sobre a diversidade de organismos e a ciclagem biogeoquímica (Vitousek et al., 1997; Karatayev et al., 2005; Guildford et al., 2008), além de afetar importantes processos ecossistêmicos como o metabolismo e o fluxo de energia (Hill et al., 2001). Reconhecer os efeitos do tipo e da intensidade de atividades antrópicas é de grande importância para a determinação do estado de estabilidade ou instabilidade estrutural e funcional de ecossistemas (Allan, 2004).

A pluma oriunda do rejeito de minério ao alcançar a coluna d'água, produz um efeito imediato na disponibilidade e na qualidade da luz, provocando reações imediatas na produção primária e na estrutura das comunidades fitoplanctônicas e bentônicas. Alterações nas comunidades aquáticas, sobretudo na base da cadeia trófica, como consequência de alterações na estrutura da coluna d'água (redução de transparência, alterações na qualidade e quantidade de luz disponível), afetam diretamente a quantidade e a qualidade nutricional dos produtores primários e levam, por sua vez, a mudanças na estrutura das comunidades do

zooplâncton herbívoro (Müller-Navarra et al., 2004). Seguem-se mudanças nas relações de competição dentro das comunidades zooplanctônicas, o que pode vir a desempenhar um papel chave na reestruturação das relações tróficas nestas condições. Portanto, ao alterar a estrutura trófica a um impacto qualquer que altere as relações de luz na coluna d'água acaba por afetar os fluxos de matéria e energia e o metabolismo de todo o ecossistema. Paralelamente, em sistemas aquáticos afetados por sedimentos finos provenientes de rejeitos da atividade mineradora, esperam-se mudanças como a diminuição da produção de algas planctônicas (devido da maior turbidez da água) e bentônicas (devido à turbidez e instabilidade hidráulica do sedimento fino) e, assim, uma menor disponibilidade alimento autóctone para a cadeia trófica. Nesses casos, a base da cadeia pode se deslocar para uma maior contribuição de material vegetal alóctone, cuja composição mineral, e bioquímica pode variar em relação àquela produzida internamente. O acompanhamento de indicadores de tais mudanças (fontes autóctones – fontes alóctones) auxilia na compreensão de como o ecossistema adjacente pode auxiliar na recomposição da cadeia aquática, mesmo que a composição da comunidade mude consideravelmente, como reflexo dos impactos na coluna d'água.

Em ecossistemas aquáticos, a composição e concentração dos ácidos graxos (FA, do inglês fatty acids) vem sendo tradicionalmente utilizadas como marcadores na caracterização da composição das comunidades (Ahlgreen et al., 2009; Sushchik et al., 2003; Brett et al., 2009; Desvillettes e Bec, 2009) e das interações tróficas em experimentos de nutrição de consumidores aquáticos (DeMott e Müller-Navarra, 1997; Becker e Boersma, 2003; Boëchat e Adrian, 2006). Além disso, a presença e a concentração de ácidos graxos essenciais, como certos polinsaturados (PUFAs) e altamente insaturados (HUFAs), vêm sendo associadas ao fitness de diferentes consumidores no campo (Goedkoop et al., 1998; Müller-Navarra et al., 2004) e em estudos de laboratório (Boëchat et al., 2005; Boëchat et al., 2006). Uma outra importante utilização dos ácidos graxos, que vem ganhando bastante espaço em estudos de monitoramento ambiental, é na avaliação da ação antrópica sobre ecossistemas aquáticos. Em um estudo recente, a composição de ácidos graxos foi a única a se correlacionar com a presença de urbanização na bacia de um rio de 5ª ordem (Rio das Mortes, MG), tendo sido um indicador mais eficiente dos impactos desta atividade do que as variáveis comumente utilizadas como descritoras da qualidade da água (Boëchat et al., 2014). Isso ocorre porque os ácidos graxos apresentam-se como marcadores bastante sensíveis para impactos específicos, como por exemplo, da entrada e composição do esgoto de origem doméstica e industrial, de material fecal animal e humano e de óleos (Queeméneur e Marty, 1994; Jardé et al., 2005). Já as razões de isótopos $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ representam uma ferramenta importante para identificar as fontes (alóctones versus autóctones) da MO em sistemas terrestres e aquáticos, uma vez que diferentes compartimentos dos ecossistemas (plantas C3, C4, fixadores de nitrogênio, fertilizantes químicos, esgoto urbano etc.) possuem assinaturas isotópicas características (Thornton & McManus, 1994).

Este subprojeto visa acessar (i) o potencial de ferramentas marcadoras bioquímicas – lipídeos totais e ácidos graxos – na avaliação direta das consequências do impacto do rejeito de mineração sobre a estrutura trófica e o fluxo de energia em ecossistemas lacustres e fluviais impactados, assim como (ii) as razões de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ da MOP dos sedimentos e do seston, para monitorar a variação espacial e temporal e as origens da MO na bacia e na pluma do Rio Doce. Esse monitoramento permite avaliar os impactos do rompimento da barragem do Fundão no contínuo aquático, e futuramente, propor ações de mitigação e recuperação.

Ao utilizar as ferramentas aqui propostas (lipídeos totais, perfil de ácidos graxos e razões isotópicas de C e N no seston e sedimentos) poderemos acessar, concomitantemente às análises limnológicas rotineiramente empregadas, informações importantes sobre a mudança na contribuição de novas fontes basais de consumo nos sistemas afetados (entradas de fontes alóctones versus fontes autóctones) e as consequências do impacto, como alterações fisiológicas nos organismos, assim como inferir a repercussão de tais alterações para a cadeia trófica. Trata-se de uma abordagem inovadora, que abraça uma postura mais ecossistêmica e, portanto, mais funcional da análise de impactos antrópicos sobre sistemas aquáticos.

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>
Concentração de lipídeos totais em amostras de seston e sedimento; Concentração de ácidos graxos saturados e insaturados em amostras de seston e sedimento; Razão isotópica de C e N em amostras de seston e sedimento; Concentração de C e N em amostras de seston e sedimento	Iola Boëchat Björn Gücker,
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise espaço-temporal da concentração de lipídeos totais e ácidos graxos saturados e insaturados no seston e sedimento (frequência mensal) Discussão da variabilidade na composição de ácidos graxos no seston e sedimento à luz das modificações físicas (alteração na intensidade luminosa causada por aumento na turbidez, aporte de material externo, etc) e biológicas (alterações na composição da comunidade) sofridas nos sistemas analisados Discussão da variabilidade nas razões isotópicas no seston e à luz das modificações físicas sofridas no sistema (alteração na intensidade luminosa causada por aumento na turbidez, aporte de material externo, etc).	Iola Boëchat Björn Gücker

6. METODOLOGIA

Amostragem de indicadores lipídicos e ácidos graxos

Serão analisados os perfis de ácidos graxos e a concentração de lipídeos totais em amostras subsuperficiais de matéria orgânica particulada em suspensão (seston) de lagos rasos e do canal riverino, e no sedimento de ecossistemas riverinos e lacustres afetados, coletadas mensalmente. As amostras de seston de lagos profundos, coletadas em diversas profundidades, serão integradas em uma única amostra. As amostras coletadas serão imediatamente filtradas em filtros de fibra de vidro GF-F de 45 mm, pré-incinerados a 450 °C por 2h. O material filtrado em replicata (até a completa saturação do filtro, anotando-se o volume filtrado) ficará acondicionado a -20°C até análise. As amostras de sedimento deverão ser secas em estufa a 30°C e acondicionadas em tubos eppendorf a -20°C até análise. Todas as amostras serão liofilizadas antes da análise.

Análises de lipídeos e ácidos graxos

Para as análises de lipídeos totais e ácidos graxos, os filtros contendo as amostras de seston filtradas, assim como as amostras de sedimento, serão submetidos a homogeneização por sonicação por 5 a 10 min. a 5000 ciclos min⁻¹ e posterior extração em solução de clorofórmio-metanol 2:1 v:v. A análise de lipídeos totais será realizada pelo método espectrofotométrico da Fosfovanilina (Zöllner e Kirsch, 1962; Ahlgreen e Merino 1991). Será utilizada uma curva padrão de ácido linoleico e a leitura será feita a 528nm. Para a quantificação dos ácidos graxos, após a extração será adicionado o padrão interno (ácido tricosanóico, 0.2 mg mL⁻¹) e as amostras serão secas sob fluxo de nitrogênio e imediatamente analisadas. A análise se dá pela formação dos metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) com a adição de ácido sulfúrico 5% v:v e o aquecimento das amostras a 80°C por 4 hs. Uma alíquota de 0.2 µL é injetada em uma coluna capilar (Omegawax 320,

Supelco 60m x 0.32 mm, ou similar) em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent, USA). A identificação dos ácidos graxos se dá por comparação dos tempos de retenção do espectro obtido para as amostras analisadas com o espectro de uma solução padrão de ácidos graxos de concentração conhecida (FAME Mix Nrs. 1 e 3, Supelco) e confirmada por comparação do espectro de massa obtido em modo full scan com aqueles presentes em uma biblioteca de espectros. A quantificação se dá por comparação da área dos picos com aquela do padrão interno adicionado após a extração.

Amostragem isótopos e análise elementar: sedimentos

Amostragem mensal, corresponde ao TR, protocolo para orgânicos. A sub amostragem do sedimento coletado com corer será feita com espátula de metal raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter em torno de 5g e deverá ser armazenada em pote de vidro (carcinado) e congelada.

Amostragem isótopos e análise elementar: seston

Amostragem trimestral, corresponde ao TR, protocolo para metais dissolvidos, mas com substituição da lavagem dos recipientes com ácido nítrico por ácido clorídrico (10%). Justificativa: A lavagem com ácido nítrico impossibilita medições confiáveis de isotopia de nitrogênio.

Análise de isótopos e análise elementar:

As análises das razões isotópicas e a análise elementar nas amostras de sedimento, seston e fontes da MO serão realizadas por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha), acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer - IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica concomitantemente às medidas de C e N, presente no laboratório do proponente. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, 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 dosagens de fósforo total serão realizadas por meio da técnica de espectrofotometria automatizada por injeção em fluxo (FIA; flow injection analysis) com o aparelho FIALab 2500 (FIALab, EUA) presente no laboratório do proponente.

Antes e depois das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizado serão p.ex. IAEA-CH3 (Celulose), IAEA-600 (cafeína), IAEA N2 (sulfato de amônio) e IAEA-NO3 (nitrato de potássio). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no calcário de Viena Pee Dee Belemnite (V – PDB) para o C e nitrogênio atmosférico, N2, para o N. Serão utilizados ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas. Demais informações sobre o método se encontram em Gücker et al. (2011).

7. REFERÊNCIAS

Ahlgren G.; Vrede, T. & Goedkoop, W. (2009). Fatty acid ratios in freshwater fish, zooplankton and zoobenthos – are there specific optima? In: Arts, M.T.; Brett, M.T. & Kainz, M.J. (orgs.). *Lipids in aquatic ecosystems*, Springer, New York.

Ahlgren, G. & Merino, L. (1991). Lipid analysis of freshwater microalgae: a method study. *Archiv für Hydrobiologie*, 121: 295–306.

Allan, D.J. (2004). Landscapes and riverscapes: The influence of land use on stream ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 35: 257–84.

Becker, C. & Boersma, M. (2003). Resource quality effects on life histories of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*. 48: 700–706.

Boëchat, I.G. & Adrian, R. (2006). Evidence for biochemical limitation of population growth and reproduction of the rotifer *Keratella quadrata* fed with freshwater protists. *Journal of Plankton Research*, 28: 1027–1038.

- Boëchat, I.G. (2005). Biochemical composition of protists: Dependency on diet and trophic mode and consequences for their nutritional quality. *Ph.D. Thesis*, Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Humboldt Universität zu Berlin, 128 p.
- Boëchat, I.G.; Krüger, A.; Chaves, R.C.; Graeber, D. & Gücker, B. (2014) Land-use impacts on fatty acid profiles of suspended particulate organic matter along a larger tropical river. *Science of the Total Environment*, 482–483: 62–70.
- Boëchat, I.G.; Weithoff, G.; Krüger, A.; Gücker, B. & Adrian, R. (2007). A biochemical explanation for the success of mixotrophy in the flagellate *Ochromonas* sp. *Limnology and Oceanography*, 52: 1624–1632.
- Brett, M.T.; Muller-Navarra, D. & Persson, J. (2009). Crustacean zooplankton fatty acid composition. In: Arts, M.T.; Brett, M.T. & Kainz, M.J. (orgs.). *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer, New York.
- Demott, W. & Müller-Navarra, D. (1997). The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwater Biology*, 38: 649–664.
- Desvillettes, C. & Bec, A. (2009). Formation and transfer of fatty acids in aquatic microbial foodwebs: role of heterotrophic protists. In: Arts, M.T.; Brett, M.T. & Kainz, M.J. (orgs.). *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer, New York.
- Goedkoop, W.; Sonesten, L.; Markensten, H. & Ahlgren, G. (1998). Fatty acid biomarkers show dietary differences between dominant chironomid taxa in Lake Erken. *Freshwater Biology*, 40: 135–143.
- Gücker, B; Brauns, M.; Solimini, A. Voss, M.; Walz, N. & Pusch, M.T. (2011). Urban stressors alter the trophic basis of secondary production in an agricultural stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68:74-88
- Guildford, S.J.; Muir, D.C.G.; Houde, M.; Evans, M.S.; Kidd, K.A.; Whittle, D.M.; Drouillard, K.; Wang, X.; Anderson, M.R.; Bronte, C.R.; Devault, D.S.; Haffner, D.; Payne, J. & Kling, H.J. (2008). PCB concentrations in lake trout (*Salvelinus namaycush*) are correlated to habitat use and lake characteristics. *Environment, Science and Technology*, 42: 8239–8244.
- Hill, W.R.; Mulholland, P.J. & Marzolf, E.R. (2001). Stream ecosystem responses to forest leaf emergence in spring. *Ecology*, 82: 2306–2319.
- Jardé, E.; Mansuy, L. & Faure, P. (2005). Organic markers in the lipidic fraction of sewage sludges. *Water Research*, 39: 1215–1232.
- Karatayev, A.Y.; Burlakova, L.E. & Dodson, S.I. (2005). Community analysis of Belarusian lakes: relationship of species diversity to morphology, hydrology and land use. *Journal Plankton Research*, 27: 1045–1053.
- Müller-Navarra, D. (2008). Food web paradigms: the biochemical view on trophic interactions. *International Review of Hydrobiology*, 93: 489–505.
- Müller-Navarra, D.; Brett, M.; Park, S.; Chandra, S.; Ballantyne, A.P.; Zorita, E. & Goldman, C.R. (2004). Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature*, 427: 69–72.
- Quéméneur, M. & Marty, Y. (1994). Fatty and sterols in domestic wastewaters. *Water Reseach*, 28: 1217–1226.
- Sushchik, N.N.; Gladyshev, M.I.; Moskvichova, A.V.; Makhutova, O.N. & Kalachova, G.S. (2003). Comparison of fatty acid composition in major lipid classes of the dominant benthic invertebrates of the Yenisei river. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 134: 111–122.

Thornton, S.F. & McManus, J. (1994). Application of organic carbon and nitrogen stable isotope and C/N ratios as source indicators of organic matter provenance in estuarine systems: Evidence from the Tay estuary, Scotland. *Estuarine and Coastal Shelf Science*, 38: 219–233.

Vitousek, P.M.; Mooney, H.A.; Lubchenco, J. & Melillo, J.M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277: 494–99.

Zöllner, N. & Kirsch, K. (1962). Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmolipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Zeits. für die gesam. Experim. Medizin*, 135: 545–561.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)**

**PROJETO: CARACTERIZAÇÃO LIMNOLÓGICA DOS ECOSISTEMAS FLUVIAIS,
LACUSTRES E ESTUARINOS DO BAIXO RIO DOCE**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Gilberto Fonseca Barroso	Coordenador de projeto e subprojetos	UFES
Bolsista de Pós-doutorado*	Organização e coordenação das amostragens em campo, levantamento, sistematização e análise de dados e produção de relatórios técnicos	UFES
Mestre II / Profissional Pleno II*	Amostragem em campo, processamento de amostras, análises hidroquímicas, sistematização e análise de dados e produção de relatórios técnicos	UFES
Mestre I / Profissional Pleno I*	Amostragem em campo, processamento de amostras, análises hidroquímicas, sistematização e análise de dados e produção de relatórios técnicos	UFES
Bolsista de Iniciação Científica*	Auxílio no processamento de amostras e análises hidroquímicas em laboratório	UFES
Bolsista de Iniciação Científica*	Auxílio no processamento de amostras e análises hidroquímicas em laboratório	UFES

* pesquisadores também alocados no Projeto Integração flúvio-estuarina: fluxos hidrológicos

2. ESCOPO

A caracterização limnológica dos ecossistemas fluvial, lacustres e estuarino do Baixo Rio Doce visa descrever as condições físicas, hidroquímicas e hidrobiológicas nas 10 estações amostrais do Anexo 3 'Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)' nos ecossistemas aquáticos continentais do Baixo Rio Doce, constante no Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. O monitoramento será realizado através de amostragens mensais em 10 estações durante um período de 12 meses. Os dados brutos e produtos esperados contemplam a variação espaço-temporal, bem como a avaliação da relação da qualidade da água, como descritos nos itens a seguir.

3. OBJETIVO

Avaliação e monitoramento biológico e da qualidade de água e sedimentos da área dulcícola/estuarina definida no Anexo 3 do TR 4. O estudo de avaliação envolve a análise dos ecossistemas aquáticos dulcícolas da calha do Rio Doce e nos lagos do Limão, Nova, Juparanã, Areal, Areão e Monsarás, além da porção estuarina da calha do Rio Doce. O monitoramento se refere ao acompanhamento de variáveis ambientais por meio de amostragem em campo com coleta de amostras, análises laboratoriais e análise e discussão de dados de ambientes aquático continental e estuarino em periodicidade amostral mensal.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 4: Monitoramento ambiental da área dulcícola em 10 estações ao longo da bacia do Rio Doce: Caracterização limnológica dos ecossistemas fluviais, lacustres e estuarino do Baixo Rio Doce

Submeta 1: Coleta de água para análises hidroquímicas e registro de parâmetros físico-químicos na coluna d'água em 10 estações amostrais conforme o Anexo 3.

Descrição: Coleta mensal em 1, 2 ou 3 profundidades distintas (superfície, meio e fundo)

Submeta 2: Coleta de sedimento para análises hidroquímicas em 10 estações amostrais conforme o Anexo 3.

Descrição: Coleta mensal de amostras de sedimento com busca fundo van Veen/Ekman

Submeta 3: Registro de parâmetros físico-químicos na coluna d'água na coluna d'água em 10 estações amostrais conforme o Anexo 3.

Descrição: Registro *in situ* de dados com perfilagem com sonda multiparâmetros e CTD

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>
<p><u>Coluna d'água</u> Perfil térmico Turbidez Oxigênio dissolvido Potencial Redox pH Condutividade elétrica Salinidade Concentração de Material Particulado em Suspensão - MPS Concentração de nutrientes (nitrogênio, fósforo e silício) Concentração de clorofila a Concentração de matéria orgânica dissolvida cromófora - MODC Concentração de elementos traço nas frações total e dissolvida (Cd, Pb, Ni, Zn, Fe, Al,)*</p> <p><u>Sedimento de fundo</u> Granulometria Teor de matéria orgânica Concentração de elementos traço nas frações total e dissolvida (Cd, Pb, Ni, Zn, Fe, Al,)*</p>	<p>Gilberto F Barroso</p> <p>*amostras a serem analisados pela Profa. Vanya Marcia Duarte Pasa (UFMG)</p>
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>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 e estuarino do Baixo Rio Doce (amostragem mensal).</p> <p>Análise espaço-temporal da variação do sedimento depositado na calha fluvial e no fundo dos lagos (quanto a granulometria e composição) dos ecossistemas aquáticos dulcícolas e estuarino do Baixo Rio Doce (amostragem mensal).</p> <p>Análise da variabilidade espaço-temporal considerando a integração dos dados da coluna d'água e sedimentos de fundo com os dados de vazão fluvial.</p>	<p>Gilberto F Barroso</p>

6. METODOLOGIA

A amostragem será realizada mensalmente, durante 12 meses, nas estações amostrais dulcícolas e estuarinas do Anexo 3 'Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)'.

Coluna d'água

A perfilagem de temperatura e salinidade será feita da superfície ao fundo por meio de CTD. Dados de condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, Potencial Redox (mV), oxigênio dissolvido (mg/L) serão registrados e por meio de sonda multiparâmetros, previamente calibrada, nas profundidades de subsuperfície, meio e próximo ao fundo em coluna d'água com mais de 3,0 m de profundidade. Em estação com profundidade inferior a 3,0 m serão feitos registros de dados físico-químicos na subsuperfície e fundo. Devido a potencial mistura da coluna d'água em estações amostrais com profundidades inferiores a 3,0 m as amostras para hidroquímica serão coletadas com garrafa de Niskin (material PVC, volume de 3L e montagem horizontal e vertical) no meio da coluna. 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, clorofila *a*, turbidez, nutrientes, matéria orgânica dissolvida cromófora - MODC serão armazenados refrigerados e ao abrigo da luz.

A turbidez será determinada com turbidímetro LaMotte 2020, previamente calibrado e os resultados expressos em UNT. As análises hidroquímicas serão realizadas em laboratório conforme *Standard Methods for Analysis of Water and Wastewater* (APHA, 2005). O MPS será determinado por gravimetria em membranas de acetato/éster de celulose (47 mm e 0,45 μm) utilizando balança analítica (0,1 mg) e os resultados expressos em mg/L. A análise da clorofila *a* ($\mu\text{g}/\text{L}$) será determinada por fluorimetria com extração em acetona 90% e acidificação para conversão de feopigmentos. A MODC será determinada por fluorimetria após as amostras refrigeradas serem filtradas em membranas de 0,45 μm e as concentrações aferidas contra solução padrão de sulfato de quinina. Alíquotas de água serão digeridas simultaneamente com persulfato de potássio para determinação de nitrogênio e fósforo total. 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 silicomolibdídico 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 cromatografia de íons, sistema Dionex IC1100.

As amostras para determinação dos elementos traço serão separadas em total e dissolvida. A amostra para determinação dos totais será preservada em campo com adição de HNO_3 e HCl para posterior digestão em microondas, seguido de quantificação em espectrometria de massa com fonte de plasma ICP-MS, conforme EPA 3015A. As amostras para determinação dos elementos traço serão previamente filtradas em membrana de 0,45 μm , sendo em seguida acidificada com HNO_3 para posterior análise ICP-MS (método EPA 6020A). As análises de elementos traço, totais e dissolvidos na coluna d'água serão realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

Sedimento

As amostras de sedimento serão coletadas com draga de Petersen no ambiente fluvial ou Ekman no ambiente lacustre. Em ambos os casos serão coletadas alíquotas de sedimento da parte central e superficial da amostra com colheres de plástico para evitar contaminação dos elementos traço. Para as amostras de contaminantes orgânicos serão utilizadas colheres de metal. Amostras de sedimento úmido serão acondicionadas em sacos plásticos do tipo zip bag previamente descontaminadas, sendo que as amostras para contaminantes orgânicos serão acondicionadas em recipientes de alumínio précalcinaados. Tal como as análises de elementos traço totais e dissolvidos da água a fração total e a parcial também serão analisadas no Departamento de Química da UFMG.

A granulometria será determinada via úmida por difração à laser no sistema Malvern. 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 concentração total de metais nos sedimentos, previamente liofilizado e macerado, seguirá pela abertura total conforme EPA 3052 com a adição de HF e HNO_3 destilados. A fração parcial de elementos traço no sedimento será processada com adição de HNO_3 , conforme o método EPA 3051A.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA (2005). *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D.C., American Public Health Association. 978-0875530475

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - DULCÍCOLA)**

PROJETO: INTEGRAÇÃO FLÚVIO-ESTUARINA: FLUXOS HIDROLÓGICOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Gilberto Fonseca Barroso e Daniel	Pesquisador Líderes do Subprojeto determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho	UFES
Pesquisador pós-doutorado*	Organização e coordenação das amostragens em campo, levantamento, sistematização e análise de dados e produção de relatórios técnicos	UFES
Profissional Pleno II*	Amostragem em campo, processamento de amostras, análises hidroquímicas, sistematização e análise de dados e produção de relatórios técnicos	UFES
Profissional Pleno I*	Amostragem em campo, processamento de amostras, análises hidroquímicas, sistematização e análise de dados e produção de relatórios técnicos	UFES
Bolsista de Iniciação Científica*	Processamento de amostras e análises hidroquímicas	UFES
Bolsista de Iniciação Científica*	Processamento de amostras e análises hidroquímicas	UFES
Daniel Rigo	Pesquisador Líder do Subprojeto Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce	UFES
Profissional - Engenheiro	Tratamento de dados de monitoramento; produção de relatórios técnicos	UFES
Bolsista Pessoal Vinculado	Análises laboratoriais, planejamento de campanhas; calibração de equipamentos	UFES
Bolsista de Apoio Técnico ou Iniciação Científica	Auxílio no tratamento de dados, relatórios e análises laboratoriais	UFES
Marco Aurélio Caiado	Pesquisador Líder do Subprojeto Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce	IFES
Pesquisador Júnior	Levantamento, sistematização, espacialização e análise de dados hidrológicos; produção de relatórios técnicos	IFES
Técnico de Nível Superior	Levantamento, sistematização, espacialização e análise de dados hidrológicos; produção de relatórios técnicos	IFES
Edmilson Costa Teixeira	Pesquisador Líder do Subprojeto Subsídios a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho	UFES
Profissional Pleno II	Levantamento, sistematização e análise de dados e informações; produção de relatórios técnicos	UFES

Técnico de Nível Superior	Levantamento, sistematização e análise de dados e informações; produção de relatórios técnicos	UFES
Bolsista de Iniciação Científica	Auxílio no levantamento e sistematização de dados e informações	UFES

* pesquisadores também alocados no Projeto Caracterização limnológica dos ecossistemas fluviais, lacustres e estuarinos do Baixo Rio Doce

2. ESCOPO

O Projeto 'Integração Flúvio-Estuarina: Fluxos Hidrológicos' é constituído de quatro atividades (subprojetos) relacionados ao entendimento da conectividade hidrológica dos sistemas fluvial-estuarino e marinho. Para isso foram previstas a modelagem hidrológica da bacia do Rio Doce, o monitoramento da vazão e descargas de água, sedimentos, nutrientes e elementos traço e a análise das relações de causa e efeito das ações de gestão sobre os fluxos hidrológicos do rio Doce para o sistema marinho adjacente. Cada Subprojeto tem seus objetivos e metas específicos; porém, no conjunto, 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 hidrológicos. A seguir são apresentados o escopo de cada um dos subprojetos:

- Subprojeto Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce

Este subprojeto tem como escopo a análise do comportamento hidrológico da bacia do Rio Doce, que resulta nas vazões que chegam à seção de referência rio-estuário, em Linhares. Entre os aspectos metodológicos do seu desenvolvimento, têm-se: o mapeamento das estações fluviométricas e pluviométricas em funcionamento em toda a bacia do Rio Doce; a análise dos seus dados; o estabelecimento de relações chuva-vazão nas diferentes sub-bacias/regiões hidrográficas que a compõem; a espacialização das informações hidrológicas; e a análise do caminhamento das águas de escoamento superficial, desde a região onde foi precipitada até a seção de controle, de forma a possibilitar o entendimento das variações de vazão e sua correspondência com a qualidade da água. O desenvolvimento do estudo também envolve visitas técnicas às diferentes sub-bacias que compõem a bacia do Rio Doce para um melhor entendimento de seus comportamentos hidrológicos.

- Subprojeto 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). Cabe observar que em períodos úmidos os valores de vazões médias mensais podem ser muito superiores à vazão médias anual e, conseqüentemente, mais elevados os valores de cargas de sedimentos aportados ao estuário e lançados no mar.

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 e suspensão tende a reduzir 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 no Rio Doce, em trecho localizado mais próximo à foz, e livre da intrusão halina durante a maré enchente no período de baixa vazão fluvial, com finalidade de subsidiar a análise de dados de pesquisadores da área biológica, auxiliando na caracterização do ambiente estudado.

- Subprojeto Determinação dos fluxos de água, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho

Visando complementar o Subprojeto 'Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce' este Subprojeto irá determinar os fluxos hidrológicos de água, sedimento, nutrientes e contaminantes (i.e., elementos traço) do Rio Doce para o estuário e sistema marinho adjacente. A conectividade hidrológica por fluxos 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).

Os fluxos serão considerados em base anual (m^3 /ano para água ou kg/ano para materiais) baseado em amostragens mensais ao longo de 12 meses na estação amostral a montante da influência do efeito represamento da vazão fluvial pela intrusão halina durante a maré enchente na seção estuarina da calha do Rio Doce. 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 do Subprojeto 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.

- Subprojeto Subsídios a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho

Este subprojeto tem como escopo a identificação e o mapeamento de ações/intervenções realizadas sobre o território delimitado pela bacia hidrográfica do Rio Doce, particularmente à montante da seção de referência rio-estuário (em Linhares), visando subsidiar a compreensão global de suas relações de causa e efeito sobre os fluxos de água, sedimentos, nutrientes e contaminantes (i.e., elementos traço) à jusante da referida seção de referência. Dentre as atividades a serem desenvolvidas estão a realização de visitas técnicas à área de estudo, o acompanhamento de reuniões ordinárias e/ou extraordinárias de Câmaras Técnicas do Comitê Interfederativo (CIF) e do Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (CBH Doce), bem como de visitas técnicas ao IBio AGB Doce e à Renova. Será realizado o respectivo levantamento de ações e gestão com potencial relação com os fluxos hidrológicos junto as diferentes instituições. O escopo envolve também o emprego de metodologias de análise integrada, buscando-se obter uma visão sistêmica de como as ações/intervenções identificadas e mapeadas podem estar influenciando nos referidos fluxos.

3. OBJETIVO

Os objetivos do Projeto serão apresentados por subprojetos que o compõem:

- Subprojeto Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce

Subsidiar à compreensão das relações chuva-vazão nas diferentes sub-bacias/regiões hidrográficas que compõem a bacia do Rio Doce e o conseqüente aporte de água na seção de controle rio-estuário em Linhares.

- Subprojeto 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.

- Subprojeto Determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho

Avaliação da conectividade hidrológica do sistema fluvio-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 da bacia e sistema marinho adjacente. A avaliação integrada do sistema fluvio-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.

- Subprojeto Subsídios a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho

Subsidiar a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxos de água, sedimentos e nutrientes no ambiente estuarino-marinho.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Nesta seção são apresentadas as submetas relacionadas aos subprojetos da Meta 4 do Programa de Monitoramento¹:

- Subprojeto Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce

Submeta 1: *Levantamento, espacialização e compilação de dados das estações pluviométricas e fluviométricas em operação na bacia do Rio Doce.* O desenvolvimento do trabalho envolve a identificação, espacialização e sistematização dos dados hidrológicos e de funcionamento das estações fluviométricas e pluviométricas instaladas na bacia do Rio Doce, abrangendo os responsáveis pela operação das mesmas, a forma de obtenção e transmissão de dados e os procedimentos que devem ser executados para obter seus dados hidrológicos. A finalização dessa atividade se dá com a categorização das estações e a escolha daquelas que serão utilizadas nas análises subsequentes. Nesta etapa dos trabalhos, será criada a base de dados para subsidiar o cumprimento das demais submetas.

Submeta 2: *Análise dos dados hidrológicos das diferentes regiões e sub-bacias que compõem o Rio Doce.* O desenvolvimento dessa atividade envolve a análise dos dados pluviométricos e fluviométricos das estações identificadas e o estabelecimento das relações de chuva-vazão nas diferentes regiões hidrográficas/sub-bacias que compõem a bacia do Rio Doce. Para o cumprimento seu comprimento, será necessária a análise de dados pluviométricos e fluviométricos pretéritos e atuais, o conhecimento dos tipos de solo e do uso do solo a partir de mapas existentes e da realização de visitas de campo para melhor conhecimento das características físicas e de uso do solo, facilitando o estabelecimento das relações causa e efeito na hidrologia da bacia do Rio Doce. O estabelecimento das relações de chuva-vazão é importante para se determinar como cada região se comporta quanto ao fornecimento de água para a calha do Rio Doce durante períodos secos e chuvosos.

Submeta 3: *Análise do caminhamento do fluxo de água de montante até a seção de controle.* Para o desenvolvimento dessa atividade, serão analisados os dados de altimetria ao longo da calha do Rio Doce e dados fluviométricos das diversas estações pluviométricas instaladas na bacia, de modo a se estabelecer a velocidade média do fluxo em cada trecho e as mudanças no hidrograma ao longo da calha do Rio Doce. Serão também analisadas as precipitações ocorrentes nas sub-bacias/regiões hidrológicas e as vazões na calha do Rio Doce e na seção de controle rio-estuário (em Linhares), de forma a se estabelecer as relações entre elas. Esta atividade se justifica pela necessidade de se compreender como cada região contribui para o fluxo de água que aporta no estuário e como se dá o caminhamento da água na calha do rio, subsidiando o entendimento das relações entre vazão e qualidade da água que aporta no estuário.

¹ Meta 4: Monitoramento ambiental da área dulcícola em 10 estações ao longo da bacia do Rio Doce: Determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho.

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

Submeta 4: *Quantificação de descargas líquidas e determinação de fluxos e níveis d'água.* Mensalmente, será realizado monitoramento, incluindo a análise multidimensional do comportamento espaço-temporal, de descargas líquidas e fluxos de água em 4 seções do estuário do Rio Doce (uma no limite fluvio-estuarino, em Linhares) por meio da utilização de ADCP (medições na seção transversal da calha fluvial). Nestas mesmas seções, serão instalados sensores de pressão para acompanhamento de níveis d'água. Os resultados obtidos serão utilizados para caracterização do ambiente e no estudo de modelagem numérica.

Submeta 5: *Estimativas de descargas sólidas.* Mensalmente, serão realizadas estimativas de descargas sólidas em 4 seções do estuário do Rio Doce, utilizando-se o método Modificado de Einstein. Para tal serão coletadas amostras de sedimentos suspensos integradas na vertical e de sedimentos de fundo. O comportamento espaço-temporal das descargas sólidas estimadas será analisado multidimensional e multicritério em subsídio à caracterização do ambiente e avaliação conjunta de dados biológicos.

- Subprojeto Determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho

Submeta 6: *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 12 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 mensal da vazão e das concentrações de sedimentos em suspensão, nutrientes e elementos traço em 4 estações amostrais no curso final do Rio Doce.

- Subprojeto Subsídios a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho

Submeta 7: *Levantamento e sistematização das ações/intervenções.* Esta atividade envolve a identificação, o mapeamento e a sistematização de ações/intervenções de gestão que estão ocorrendo na bacia hidrográfica do Rio Doce, especialmente na porção localizada à montante da seção de referência rio-estuário (em Linhares). Para isso, serão consultados documentos produzidos no âmbito da Renova, do CIF e de suas Câmaras Técnicas, dos Comitês de Bacia Hidrográfica (CBHs) na região hidrográfica do Doce, do IBio AGB Doce, entre outros. Também estão previstas visitas técnicas a algumas dessas Câmaras Técnicas e à área de estudo. As ações que estão sendo realizadas, bem como sua espacialização sobre o território, serão categorizadas por temática.

Submeta 8: *Acompanhamento das ações realizadas e levantamento sistemático de dados e informações.* A atividade envolve o acompanhamento das ações realizadas e o levantamento de dados e informações associados a elas, que, para seu cumprimento, será necessário esforço de articulação institucional e mobilização de atores-chave. Para isso, está prevista a participação em reuniões de Câmaras Técnicas do CIF, do CBH Doce, assim como visitas técnicas ao IBio AGB Doce e à Renova, entre outras instâncias que forem identificadas como relevantes no presente contexto. Também estão previstas visitas à área de estudo para observar *in loco* algumas das ações que estão sendo realizadas que poderão subsidiar o desenvolvimento dessa atividade. Todas as informações e dados coletados serão armazenados em um banco de dados para subsidiar a análise de causa e efeito sobre os fluxos de água, sedimentos e nutrientes na seção de referência rio-estuário.

Submeta 9: *Análise integrada dos reflexos de ações/intervenções identificadas na bacia.* Para o desenvolvimento dessa atividade, serão utilizadas metodologias de análise integrada multidimensional & multicritério, visando compreender, por meio de visão sistêmica, as relações de causa e efeito das ações/intervenções realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce – à montante da seção de referência fluvio-estuarino (em Linhares) – sobre o aporte de fluxos de água, sedimentos, nutrientes no ambiente estuarino-marinho. De início, todas as informações e dados levantados, no que tange às ações/intervenções mapeadas, serão trabalhados de forma individualizada para identificação de potenciais impactos (sinergias e *trade-offs*) sobre os fluxos supracitados. Identificados os possíveis impactos, essas informações serão correlacionadas

com dados de chuva, vazão e carga de nutrientes, buscando elucidar relações de sinergia e *trade-off* e de causa e efeito do conjunto de ações identificadas.

5. PRODUTOS

Nesta seção são apresentados os produtos relacionados aos subprojetos da Meta 4 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>
<ul style="list-style-type: none"> • Determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho - Produção anual de água (m³), sedimentos em suspensão (t), nutrientes (kg) e metais (kg) do sistema fluvial 	<p style="text-align: center;">Gilberto F Barroso e Daniel Rigo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce - 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. 	<p style="text-align: center;">Daniel Rigo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce - Dados hidrológicos das estações fluviométricas e pluviométricas em funcionamento na bacia do Rio Doce; - Posicionamento geográfico das estações; - Dados de funcionamento das estações pluviométricas e fluviométricas – responsáveis pela operação das mesmas, forma de obtenção e transmissão de dados e os procedimentos que devem ser executados para obter seus dados hidrológicos; - Mapas pedológicos e de uso do solo da bacia do Rio Doce; - Altimetria ao longo da calha do Rio Doce. 	<p style="text-align: center;">Marco Aurélio Caiado</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Subsídio a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho - Documentos produzidos no âmbito da Renova, do CIF e de suas Câmaras Técnicas, dos Comitês de Bacia Hidrográfica (CBHs), do IBio AGB Doce, entre outros; - Dados e informações das ações/intervenções. 	<p style="text-align: center;">Edmilson Costa Teixeira</p>

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho - Análise da variação espaço-temporal dos fluxos hidrológicos na porção final do Rio Doce baseado em amostragem mensais. 	<p style="text-align: center;">Gilberto F Barroso e Daniel Rigo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce - 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. 	<p style="text-align: center;">Daniel Rigo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce - Especialização das estações pluviométricas e fluviométricas; - Compilação dos dados hidrológicos e de funcionamento de cada estação; - Escolha das estações que servirão de base para os trabalhos das etapas subsequentes; - Análise da qualidade dos dados e facilidade de se obter os dados hidrológicos em tempo real; - Compilação de mapas pré-existentis; - Refinamento de mapas a partir de dados colhidos no campo; - Estabelecimento de relações chuva-vazão nas sub-bacias/regiões hidrológicas que compõem a bacia do Rio Doce; - Avaliação das mudanças do hidrograma entre as estações fluviométricas em funcionamento na calha do Rio Doce; - Estabelecimento da velocidade média da água nos trechos ao longo da calha do Rio Doce; - Avaliação das relações entre as chuvas nas sub-bacias/regiões hidrológicas e o fluxo d'água que aporta no estuário; 	<p style="text-align: center;">Marco Aurélio Caiado</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Subsídio a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho - Categorização e mapeamento das ações/intervenções; - Avaliação dos potenciais impactos de cada uma das ações/intervenções identificadas; - Avaliação dos potenciais impactos do conjunto de ações/intervenções. 	<p style="text-align: center;">Edmilson Costa Teixeira</p>

6. METODOLOGIA

Nesta seção são apresentados aspectos metodológicos relacionados a cada uma das quatro atividades (subprojetos) do Projeto Integração Flúvio-Estuarina. As amostragens em campo serão realizadas em 4 estações amostrais, sendo a estação defrontante à Linhares (i.e., estação 21 do Anexo 3 do TR4) a estação de referência, por estar localizada à montante do estuário superior, ou seja, livre dos efeitos do represamento pelas marés enchentes durante os meses de baixa vazão fluvial. Duas estações à jusante (i.e., estações 22 e 26 do Anexo 3 do TR4) funcionam para avaliação dos efeitos da influência estuarina, além da estação 04 da porção dulcícola do Anexos 7 (Ictiofauna).

- Caracterização hidrológica global para compreensão do aporte de água doce no ambiente estuarino-marinho do Rio Doce

Serão levantadas junto à ANA, INCAPER, INMET, IGAM, RENOVA e outros órgãos as estações fluviométricas e pluviométricas em funcionamento na bacia do Rio Doce. Suas posições geográficas serão compiladas em sistema de informação geográfica e elaborado um mapa com a espacialização das mesmas.

Os dados hidrológicos das estações fluviométricas e pluviométricas identificadas e que estiverem disponíveis na rede mundial de computadores serão obtidos e sistematizados em banco de dados apropriado. Serão feitos contatos com os órgãos responsáveis pela operação das estações, de forma a se conhecer a forma de obtenção e transmissão de dados e os procedimentos que devem ser executados para obter seus dados hidrológicos que não estiverem prontamente disponíveis.

As estações serão categorizadas em termos de qualidade dos dados e posição geográfica e escolhidas as que serão utilizadas para o cumprimento das próximas metas.

Serão realizadas análises de consistência de dados das estações escolhidas, com foco na qualidade dos dados e na facilidade de se obter os dados hidrológicos em tempo real.

Será realizado levantamento dos mapas e imagens existentes que encobrem a bacia do Rio Doce. Estes serão levados a sistema de informação geográfica e recortados os mapas, de forma a caracterizar as sub-bacias/regiões hidrológicas que compõem a bacia no que tange a pedologia e uso do solo

Serão realizadas visitas de campo na bacia do Rio Doce, de forma a se visualizar a calha do rio, o relevo, uso do solo e pedologia, visando o refinamento dos mapas existentes.

Com base nos dados de chuva e de vazão das estações escolhidas e nas características físicas e de uso do solo das sub-bacias/regiões hidrológicas, serão estabelecidas as relações entre as chuvas precipitadas e as vazões advindas das mesmas e que chegam na calha do Rio Doce.

A partir dos dados de altimetria ao longo da calha do Rio Doce e dados fluviométricos das estações fluviométricas existentes na calha do mesmo, será estabelecida a velocidade da água e as mudanças no hidrograma ao longo da mesma. Para tanto, serão utilizadas planilhas eletrônicas e sistema de informação geográfica como ferramentas de análise.

A partir das relações chuva-vazão estabelecidas para as sub-bacias/regiões hidrológicas, da velocidade da água e do entendimento das mudanças no hidrograma ao longo da calha, será estabelecida a relação das precipitações ocorrentes nas sub-bacias/regiões hidrológicas e o fluxo de água que aporta no estuário do Rio Doce.

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

As medições de vazão e fluxos d'água serão feitas em 4 seções, 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 nas mesmas seções em que serão feitas as medições de vazão, 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:

- o vazão (m^3/s);
 - o velocidade média de escoamento (m/s);
 - o área da seção transversal (m^2);
 - o largura da seção transversal (m);
 - o profundidade média das verticais de coletas de sedimentos (m);
 - o concentração de sedimentos em suspensão (ppm ou mg/l);
 - o distribuição granulométrica de materiais do leito e em suspensão coletados na seção (m);
 - o temperatura da água ($^{\circ}C$).
- Subprojeto Determinação dos fluxos de água, sedimentos em suspensão, nutrientes e metais do sistema fluvial para o sistema estuarino-marinho

Os dados de vazão fluvial e sedimentos em suspensão serão obtidos do subprojeto “Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do Rio Doce” enquanto os dados de nutrientes (i.e., nitrogênio, fósforo e silício) e metais serão fornecidos pelo Projeto “Caracterização limnológica dos ecossistemas fluviais, lacustres e estuarinos do Baixo Rio Doce”, também do Anexo 3. A frequência amostral para coleta de água será mensal sendo e equivalente e concomitante com a amostragem no sistema marinho adjacente. A partir destes dados serão estimados os fluxos mensais e anuais de água (m^3), sedimentos, nutrientes e metais (kg). Os fluxos serão determinados por meio da equação Q_{ss} , conforme detalhado no subprojeto anterior.

- Subsídio a compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, sedimentos e nutrientes no sistema estuarino-marinho

Serão levantadas as ações/intervenções já realizadas e em execução na bacia hidrográfica do Rio Doce na porção localizada acima da seção de referência rio-estuário (em Linhares). Para tanto, serão realizadas consulta a documentos produzidos por entidades responsáveis por intervenções na bacia - Renova, CIF e suas Câmaras Técnicas, Comitês de Bacia Hidrográfica (CBHs), IBio AGB Doce, entre outras - e definidas aquelas em que serão realizadas visitas para acompanhamento das ações/intervenções potencialmente impactantes nas análises subsequentes previstas neste subprojeto.

No que se refere à sistematização das ações/intervenções, será realizada a categorização de ações/intervenções que estão sendo realizadas na bacia, bem como sua espacialização sobre o território, delimitado pelas sub-bacias. Neste sentido, as ações levantadas serão diferenciadas e classificadas conforme a temática. Adicionalmente, será utilizado um software de Sistema de Informações Geográficas para o mapeamento georreferenciado das ações/intervenções e atribuição das informações de suas classes.

Visando o acompanhamento das ações/intervenções realizadas, será empenhado esforço de articulação com os entes envolvidos para aquisição de dados e informações correspondentes. Para isso, serão realizadas visitas à Renova, IBio AGB Doce, IEMA, SEAMA e ICMBio/ES; participação em reuniões de

Câmaras Técnicas do CIF e de Comitês de Bacia Hidrográfica na região hidrográfica do Doce, entre outras; além de pesquisas em bases públicas e sites. Também estão previstas visitas à área de estudo para observar *in loco* algumas das ações que estão sendo realizadas.

Serão selecionados dados e informações relacionados a chuva, vazão, carga de sedimentos e nutrientes da Base de Dados Geral do Projeto, a fim de subsidiar a execução das atividades subsequentes. Em seguida, estes dados serão tratados para atender as especificações de cada uma das atividades previstas.

Todas as informações e dados coletados nas atividades anteriores serão armazenados em um banco de dados para subsidiar a análise de sinergias e *trade-offs* do conjunto de ações identificadas sobre os fluxos de água, sedimentos e nutrientes na seção de referência rio-estuário. Posteriormente, todas as informações produzidas serão inseridas no Banco de Dados Geral do Projeto.

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 o aporte de fluxos de água, sedimentos e nutrientes na conexão rio-estuário. Deste modo, será buscada a identificação de fatores-chave e seu respectivo potencial para propiciar variações nesses fluxos, baseando-se na experiência da equipe técnica e em bibliografia especializada.

Inicialmente será realizada uma avaliação dos potenciais impactos do conjunto de ações/intervenções realizadas na bacia considerando dois períodos: anteriormente ao rompimento da barragem de Fundão/Samarco e pós-rompimento até o mês de agosto de 2018. Entre os documentos a serem consultados inclui-se o relatório a ser elaborado no âmbito do presente Acordo de Cooperação Renova - FEST sobre avaliação de impacto agudo e crônico devido ao rompimento da supracitada barragem, utilizando-se dados pretéritos.

Em seguida, será possível estabelecer, entre as diversas ações/intervenções identificadas, relações de sinergia e *trade-off*. O melhor entendimento dessas relações subsidiará a avaliação do impacto do conjunto de ações, como um todo, ou de conjuntos de ações. E para auxiliar nessa avaliação, as informações produzidas serão correlacionadas com informações disponíveis sobre chuvas na bacia e, principalmente, de vazão e descarga de sedimentos e nutrientes obtidas na seção de referência flúvio-estuarina (em Linhares). Essa correlação contribuirá para maior compreensão global das relações de causa e efeito do conjunto de ações realizadas na bacia hidrográfica do Rio Doce sobre o aporte de fluxo de água, de sedimentos e de nutriente no ambiente estuarino-marinho.

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
- CARVALHO, N. O. (2008). *Hidrossedimentologia prática*. 2^o ed. Rio de Janeiro, Interciência
- 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.
- CROSSLAND, C. J., KREMER, H. H., LINDEBOOM, H. J., MARSHALL, J. I., MARSHALL-CROSSLAND, J. 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,
- MILLIMAN, J.D. & FARNSWORTH, K.L. (2011). *River discharge to the coastal ocean: a global synthesis*. Cambridge, Cambridge University Press. 978-1107612181
- 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

REDE RÍO DOCE



Proposta de Adequação de Estações Amostrais e Frequência Amostral para o sistema dulcícola do Baixo Rio Doce (Anexos 2 e 3, Área Ambiental 1)

**Vitória,
18 de julho de 2018**

PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA DA ÁREA AMBIENTAL 1

APRESENTAÇÃO

O presente documento apresenta as justificativas para as adequações em algumas especificações do Termo de Referência (TR4), apresentadas na Proposta Técnica para a execução do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental 1, pela Rede Rio Doce Mar. Todas as adequações foram recomendadas por especialistas nas respectivas áreas e visam a viabilidade, a qualidade e a eficiência do programa de monitoramento. As adequações são referentes aos Anexos 2 e 3 do TR 4. A grade amostral do sistema dulcícola (10 estações) do Anexo 3 é apresentada na figura 1.

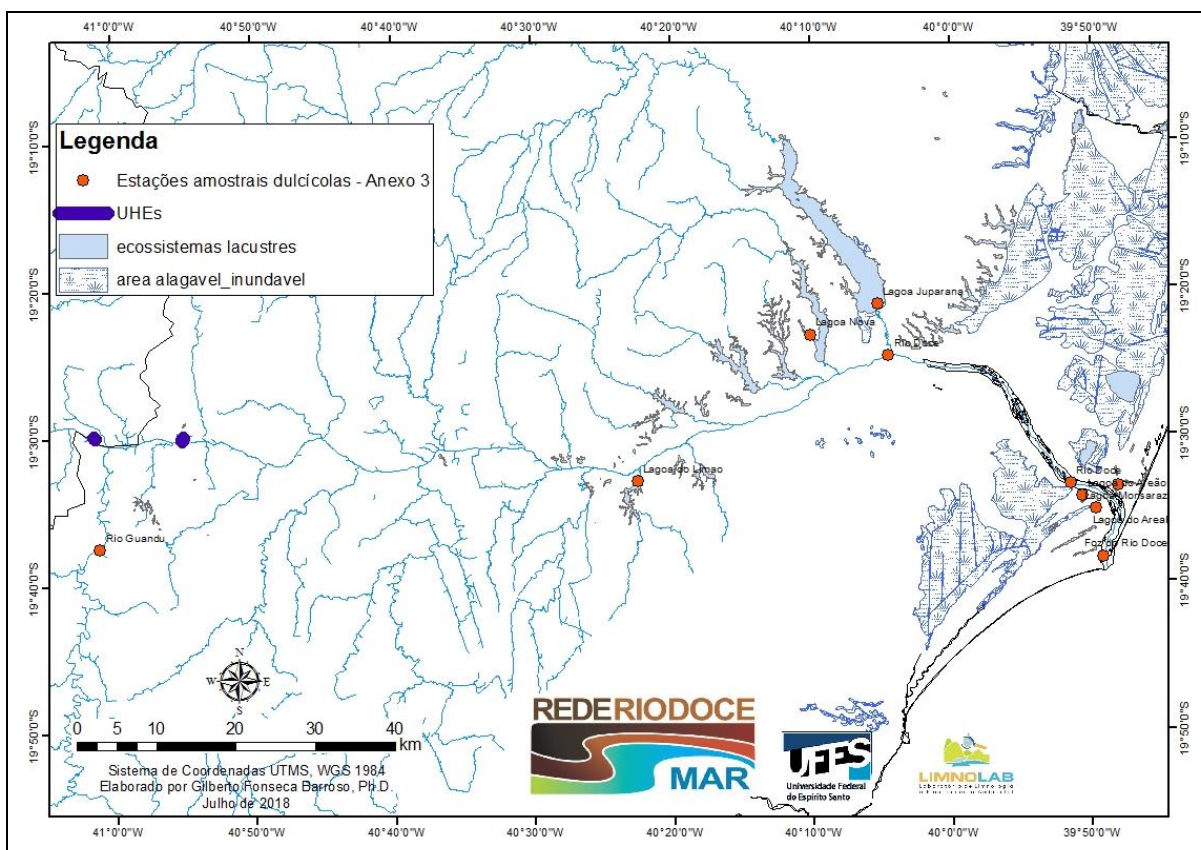


Figura 1: Estações amostrais dulcícolas do Anexo 3.

2. ANEXOS 2 E 3

Os Anexos 2, flora aquática (08 estações) e 3 apresentam sobreposições das estações amostrais na calha do Rio Doce nas localidades de Linhares e Regência (Figura 2). São recomendados ajustes na grade amostral das estações dos anexos 2 e 3, conforme a Figura 3.

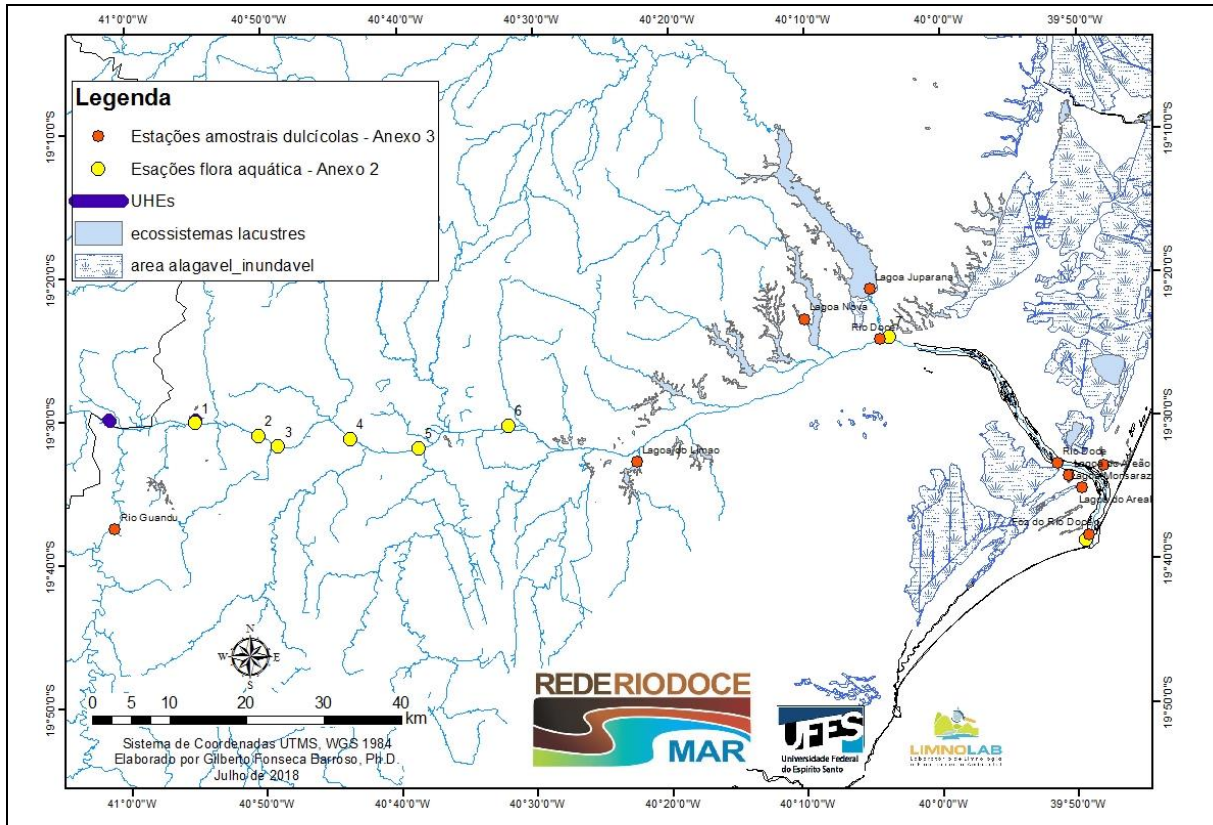


Figura 2: Estações amostrais dulcícolas dos Anexos 2 e 3.

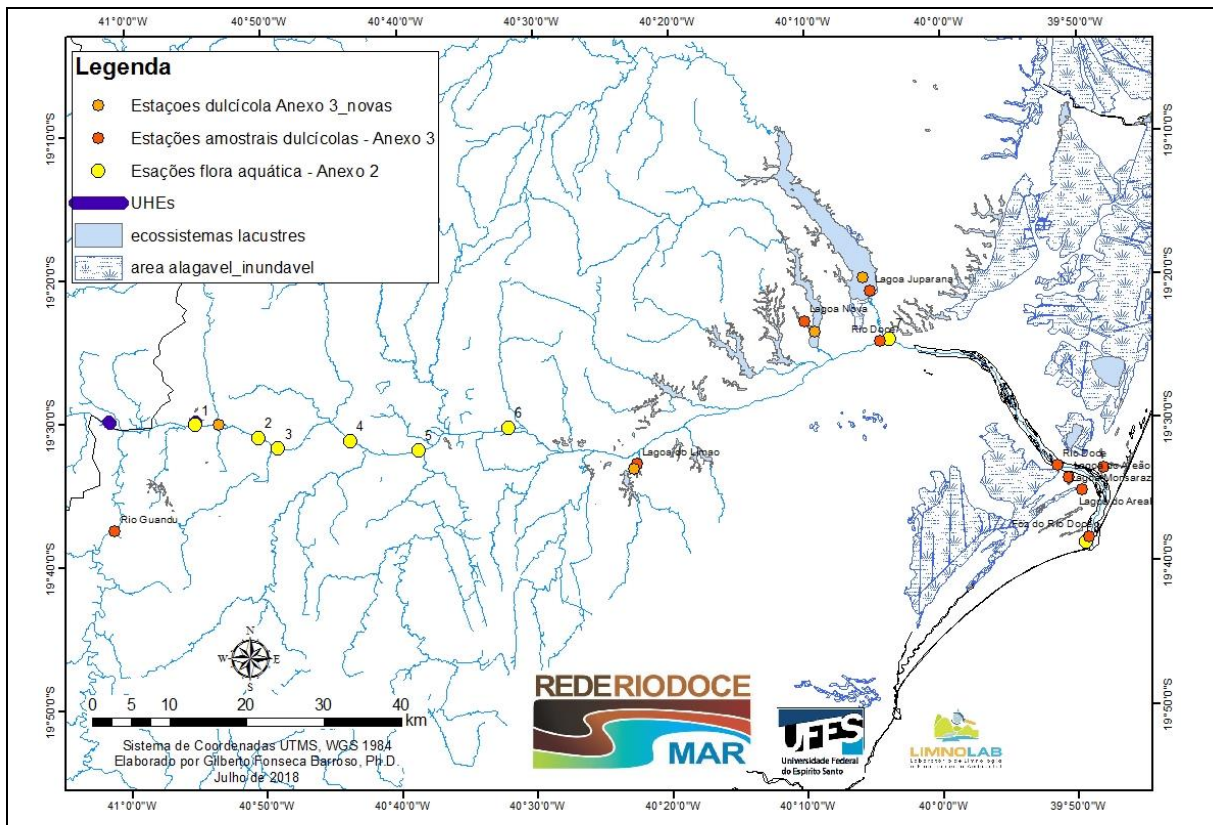


Figura 3: Estações amostrais dulcícolas dos Anexos 2 e 3 e adequações das estações do Anexo 3.

2.1 Amostragem no sistema fluvial do Baixo Rio Doce

Considerando que a distância entre UHE de Mascarenhas e a foz do Rio Doce é de 151 km e que a estação mais a montante é a estação de Linhares (Anexo 3) que dista 42 km da foz, vimos propor a inclusão da estação à jusante da UHE de Mascarenhas, distando 136 km da foz (Figura 4). Nesta estação a amostragem será completa considerando a hidroquímica e hidrobiologia. A nova estação funcionará como referência após a última barreira fluvial, represamento para aproveitamento hidrelétrico, com potencial de sedimentação do material particulado em suspensão.

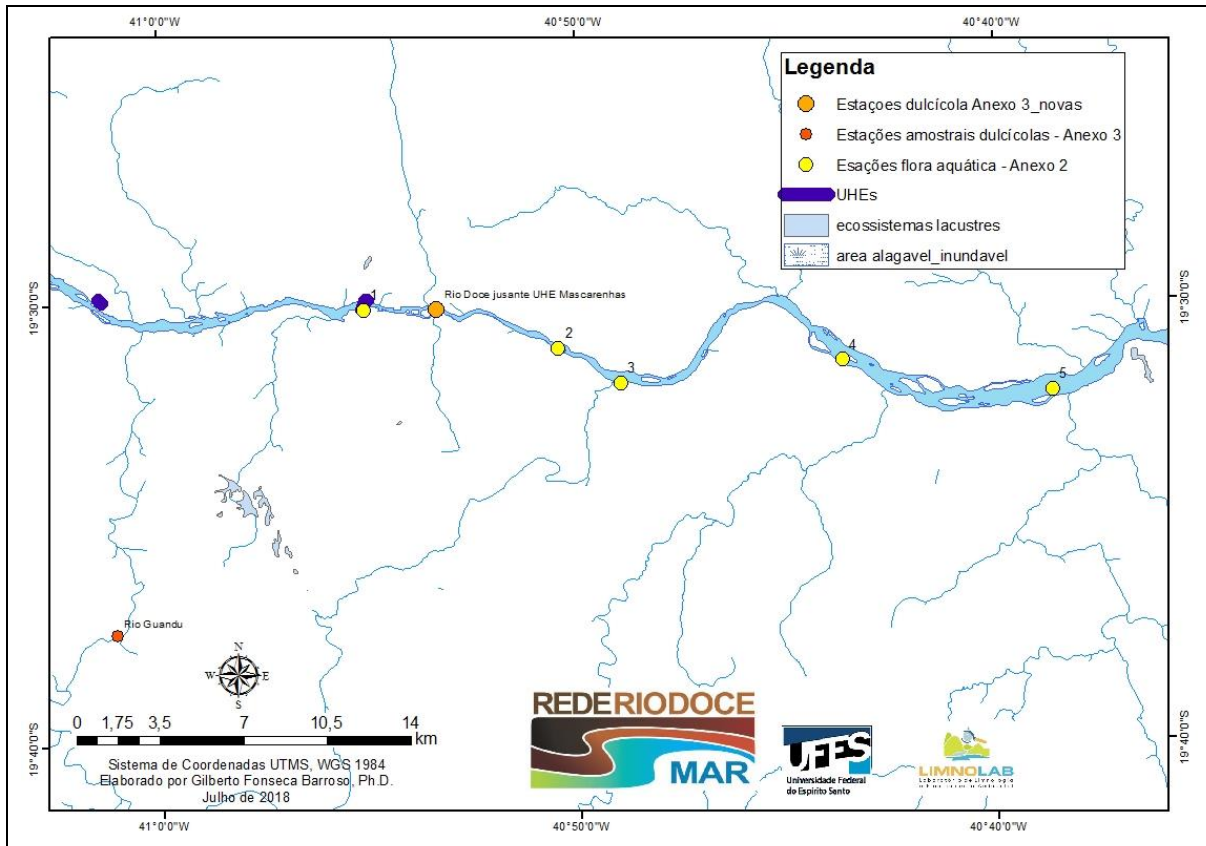


Figura 4: Localização da estação amostral proposta para calha fluvial do Rio Doce: estação à jusante da UHE de Mascarenhas.

2.1.1. Coleta de amostras de parâmetros hidroquímicos nas profundidades de subsuperfície e fundo ao invés de superfície, meio e fundo da coluna d'água

Considerando a turbulência da coluna d'água pela correnteza fluvial espera-se que haja significativa mistura da massa d'água. Deste modo, as características hidroquímicas (e.g., pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, nutrientes, etc) devem ser muito próximas entre a superfície e a profundidade de meia água. Assim, sugere-se que as amostragens hidroquímicas sejam realizadas apenas nas profundidades de subsuperfície e fundo. Ressalta-se que as diferenças podem ser significativas entre a superfície e o fundo, sobretudo em relação ao material em suspensão transportado como carga de fundo, principalmente na seção estuarina, onde os processos físico-químicos de sedimentação do material particulado são mais intensivos.

2.2. Amostragem nos lagos Nova, Limão e Juparanã e Lagoa Monsarás.

2.2.1. Reposicionamento das estações amostrais nos lagos Nova, Limão e Juparanã e Lagoa Monsarás.

A localização original das estações amostrais do Anexo 3 para os lagos Nova, Limão e Juparanã está em locais de baixa profundidade (< 5,0 m), sendo propensos a resuspensão e remobilização de sedimentos pela turbulência do vento na coluna d'água. Assim, sugerimos reposicionar as estações destes lagos para maiores profundidades, onde o processo de sedimentação é mais efetivo com sedimentos finos e acúmulo de poluentes e contaminantes, além da possibilidade de resuspensão ser menor. No lago Nova, onde houve intrusão de rejeitos de minério com o evento de cheia do final de janeiro de 2016 (Figuras 5 e 6). No caso do Lago Juparanã, embora não tenha ocorrido intrusão de rejeitos devido ao represamento prévio do Rio Pequeno, a entrada de água do rio Doce no lago durante eventos de cheia é conhecida e pode ser identificada a partir de imagens de satélite (Figura 7). A Figura 8 apresenta a localização sugerida para estação no lago do Limão.

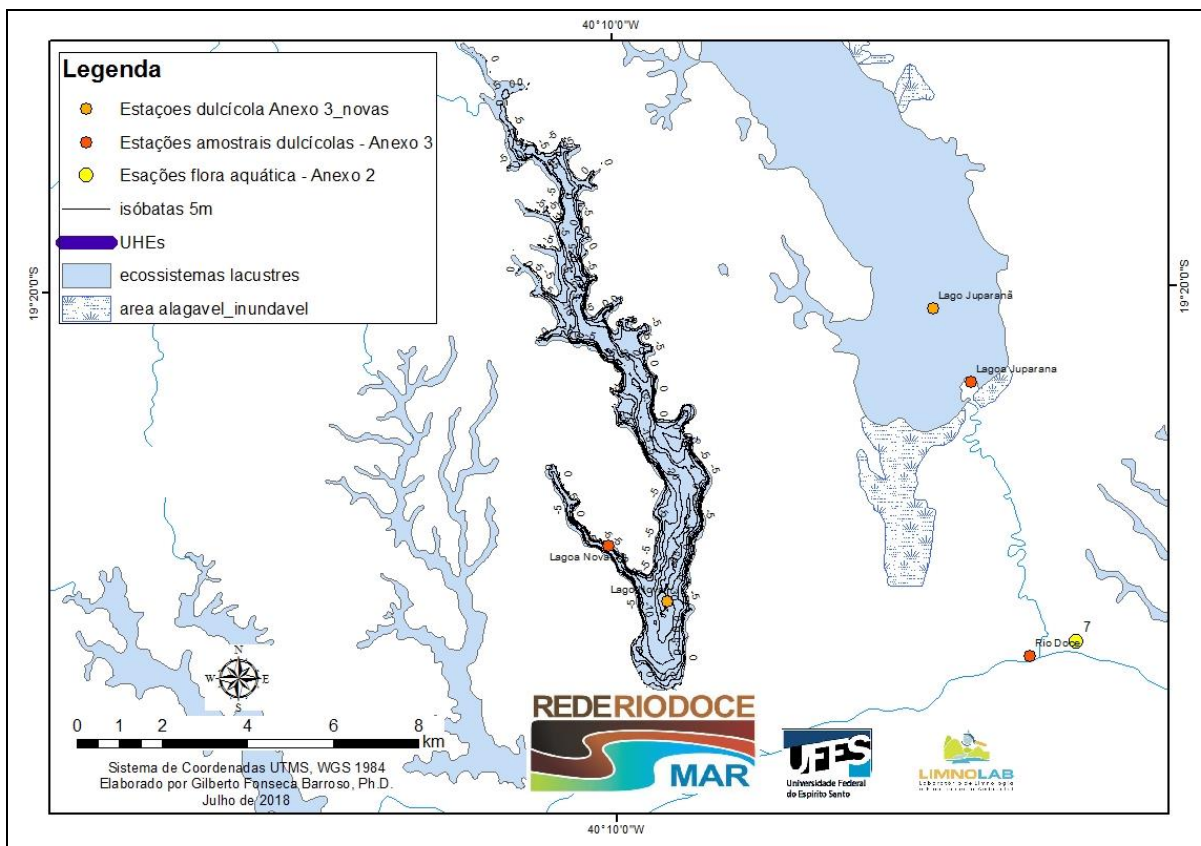


Figura 5: Reposicionamento da estação amostral no Lago Nova: estação original localizada o 'braço' do lago e reposicionamento da estação com profundidade de 30 m. Dados batimétricos conforme Gonçalves et al. (2016).



a)



b)

Figura 6: Intrusão da pluma de rejeitos de minério no Lago Nova com a cheia do Rio Doce em 25 de janeiro de 2016. a) intrusão da pluma do Rio Doce com rejeitos de minério de ferro pelo córrego de drenagem do Lago Nova; b) perspectiva da intrusão da pluma do Rio Doce no Lagoa Nova com alcance à montante do embaçamento e até a primeira inflexão do eixo longitudinal da bacia lacustre. Fotografias de Bruno Sibilio Barra (Vertical Fun Images).

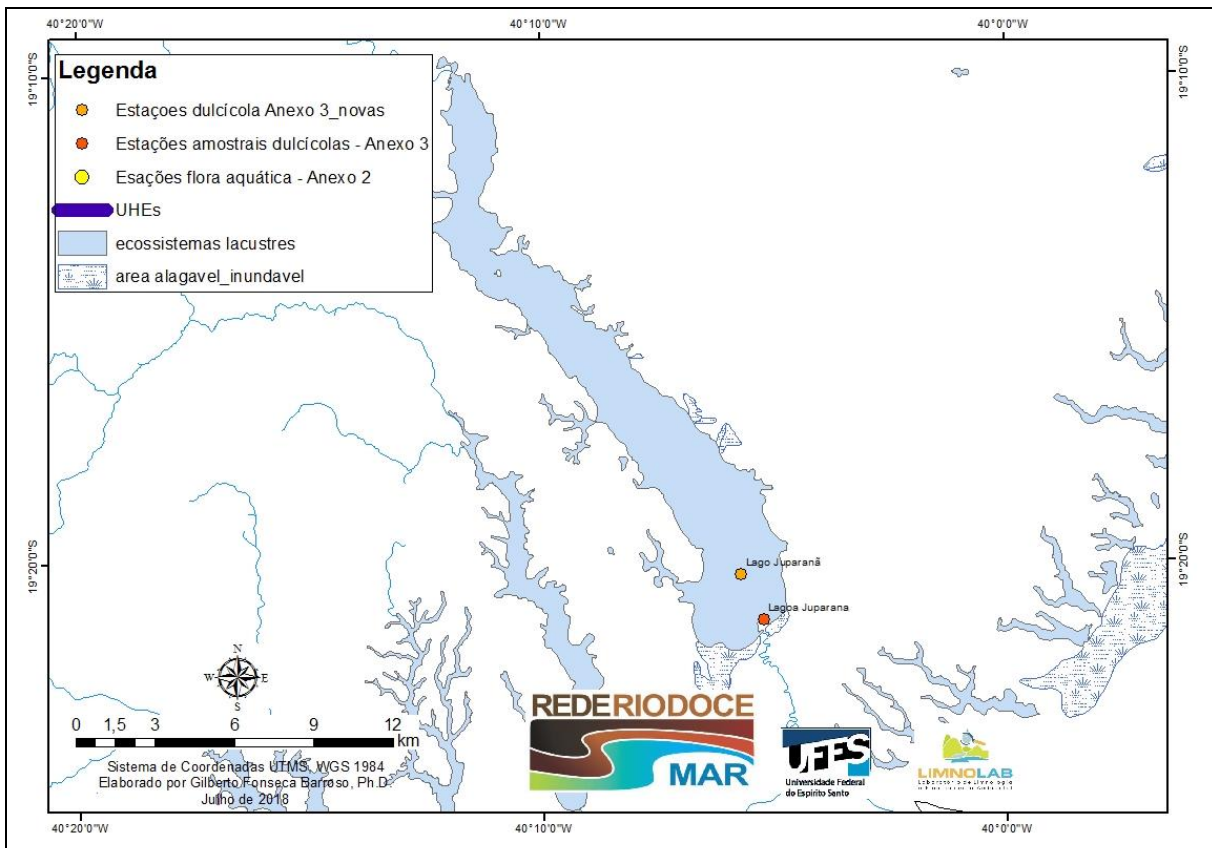


Figura 7: Reposicionamento da estação amostral no Lago Juparanã: estação original em com até 5m e estação amostral reposicionada em local com profundidade > 5,0 m em área de influência direta da pluma do rio Doce.

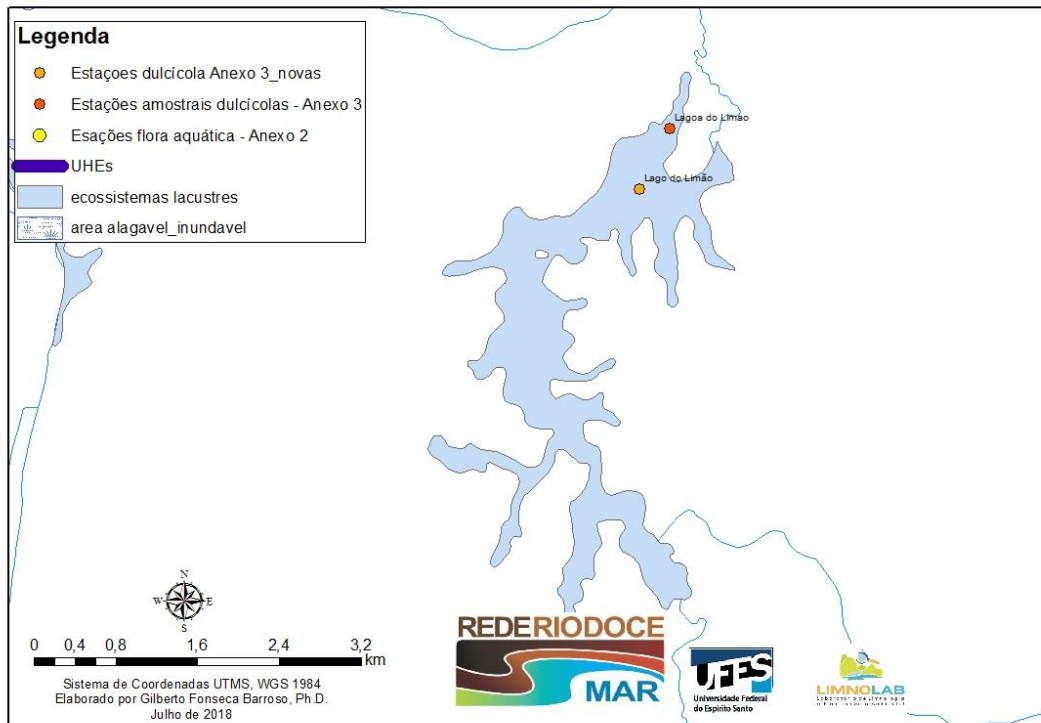


Figura 8: Reposicionamento da estação amostral no Lago do Limão: estação original em com até 5m e estação amostral reposicionada em local com profundidade > 5,0 m em área de influência direta da pluma do rio Doce.

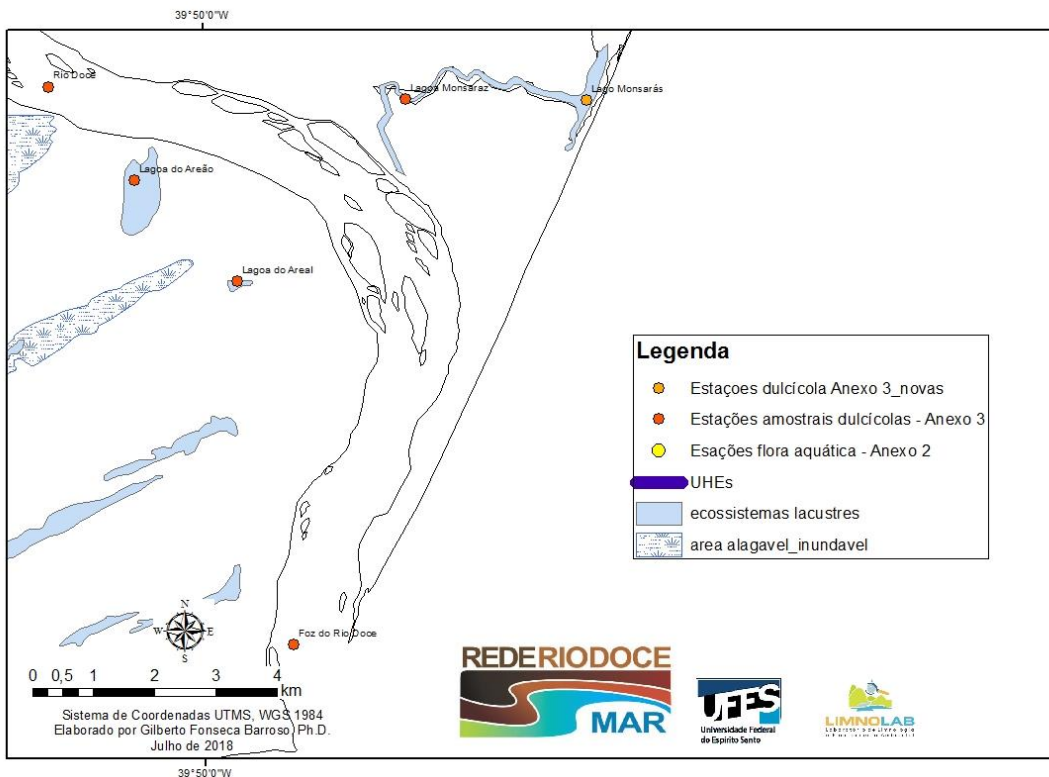


Figura 8: Reposicionamento da estação amostral na Lagoa Monsarás para área mais larga em profunda da lagoa..

2.2.2. Profundidade de amostragem nas lagoas Areão, Areal e Monsarás

Devido a baixa profundidade (< 3,0 m) dos ecossistemas lacustres da planície costeira do Baixo Rio Doce, como as lagoas Areão, Areal e Monsarás (Bozelli et al., 1992) e, portanto, maior potencial de turbulência do vento na coluna d'água com a consequente homogeneização da massa d'água, sugere-se uma única amostragem para hidroquímica em meia profundidade.

2.2.3. Profundidades de amostragem nos lagos Nova, Limão e Juparanã

A organização vertical da coluna d'água com gradientes físicos, químicos e hidrobiológicos em lagos profundos (> 5 m) promove a formação de zonas ou massas d'água com propriedades distintas. Assim, para avaliação mais precisa dos efeitos dos rejeitos de minério de ferro na coluna d'água é necessário realizar amostragens em diferentes profundidades como: subsuperfície, 10% da radiação fotossintética ativa (RFA), 1% da RFA e fundo da coluna d'água. Considere, por exemplo, o lago Nova com profundidade máxima e média de 33,9 e 14,7 m, respectivamente (Gonçalves et al., 2016).

Em cada estação amostral deverão ser realizados perfis de temperatura (°C), oxigênio dissolvido com sensor óptico (mg.L^{-1}), pH, ORP (mV) condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$), ficocianina (células.mL^{-1}), clorofila ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e turbidez (UNT) com uma sonda multiparâmetros do tipo Exo2 e registro de dados a cada metro de profundidade. Deverá ser medida a profundidade do disco de Secchi. As amostragens de MPS e nutrientes totais e dissolvidos deverão ser coletadas com garrafa de Niskin em posição vertical (volume 3L) nas profundidades de subsuperfície, 10% da radiação fotossintética ativa (RFA), 1% da RFA e fundo da coluna d'água.

2.3. Amostragem de sedimentos nos ecossistemas lacustres

2.3.1. Amostragem de sedimentos com testemunhos

As bacias lacustres apresentam três áreas distintas quanto ao processo de sedimentação: áreas de erosão, transporte e sedimentação (Hakanson & Jansson, 2002). As áreas de erosão são encontradas nas margens com maior declividade, enquanto as áreas de transporte em declividade moderada e baixa profundidade com susceptibilidade a turbulência da coluna d'água pelo vento. Já as áreas de sedimentação ocorrem em regiões profundas e com declividade suave. Estas últimas são as mais representativas para amostragem de sedimento, sobretudo para coleta de testemunhos. Para fins de comparação recomenda-se a coleta de 1 testemunho em cada lago/lagoa conforme o novo posicionamento das estações amostrais. Para amostragem dos testemunhos recomenda-se o coletor do tipo "*gravity core with hammer*" da Uwitec (www.uwitec.at/html/frame.html) com tubos de 1,20 m e fatiador. Os testemunhos serão analisados quanto as concentrações de matéria orgânica, elementos traço e granulometria.

2.4. Amostragem do fitoplâncton

2.4.1. Amostragem do fitoplâncton fluvial: frequência amostral e número de amostras por estação

As amostragens de fitoplâncton devem ser realizadas mensalmente e somente na calha central do rio, como vem sendo feito em outros sistemas fluviais brasileiros (Train et al., 2000, Goulart & Callisto, 2003; Mouta et al., 2009, Rangel et al., 2016). A dinâmica do fitoplâncton em rios varia mais em função da hidrodinâmica longitudinal, influenciada pela entrada de material alóctone, que causa variações na entrada de luz e nutrientes, do que quanto a hidrodinâmica transversal (Wetzel, 2001). A variação temporal do fitoplâncton é influenciada pelo ciclo de pluviosidade com picos de biomassa que ocorrem durante os períodos seco ou chuvoso, ou no início ou final de cada período (Huszar et al., 2000). Assim, amostragens mensais são suficientes para obter respostas sobre a variação da diversidade e biomassa fitoplanctônica.

Para a análise qualitativa do fitoplâncton deverá ser coletada somente uma amostra em cada ponto amostral através de arrasto superficial com rede de malha de 20 µm. Deve-se separar a amostra em duas partes e acondicionar em frascos de polietileno (100 mL): uma será fixada com formol 4% - adicionar 10 mL; o outro frasco deverá ser mantido sem preservante, em caixa térmica para análise do material vivo (não congelar).

Nos Anexos 2 e 3 do TR 4 há inconsistência quanto a frequência amostral e número de amostras a serem coletadas. O Anexo 2, primeira linha da página 11 (Item 3.3. Flora aquática: fitoplâncton, perifíton, zooplâncton e macrófitas aquáticas), informa que "*As coletas deverão ser feitas em período quinzenal e deverão ser coletadas pelo menos três amostras de material vegetativo por ponto de coleta*", enquanto no Anexo 3, página 11 a frequência amostral (item 3.1. Periodicidade das amostragens) é mensal. Assim, recomendamos a amostragem mensal com uma única amostra por estação amostral, coletada no centro da calha fluvial.

2.4.2. Amostragem do fitoplâncton lacustre: profundidades nas estações amostrais em lagos profundos

Nos lagos profundos localizados na Formação Barreiras é comum a ocorrência de máximos metalimnéticos de clorofila *a* e, conseqüentemente, do fitoplâncton lacustre (Reynolds, 1997; Gonçalves, 2015; Oliveira et al., 2016). Em lagos profundos, sobretudo nos lagos do Médio e Baixo Rio Doce é comum que o máximo de clorofila *a* ocorra na interface entre a camada d'água superficial (i.e., epilímnio) e a camada de fundo (i.e., hipolímnio). A camada do epilímnio é mais quente, com menor densidade, bem iluminada e mais pobre em nutrientes. A camada do fundo é mais fria, com maior densidade, escura e rica em nutrientes. Na camada intermediária (i.e., metalímnio) ocorre a termoclina, geralmente acompanhada de um gradiente da concentração de nutrientes, a nutriclina. Nessa profundidade, geralmente encontra-se a interface entre as camadas iluminada e escura da coluna d'água, sendo a medida de 1% da radiação superficial como limite entre as duas camadas. As figuras 9a e 9b ilustram estes gradientes no Lago Terra Alta em Linhares.

Assim, recomenda-se que a amostragem do fitoplâncton lacustre dos lagos profundos (Juparanã, Nova e Limão) seja feita na subsuperfície e na profundidade de 1% da radiação fotossintética ativa - R.F.A.

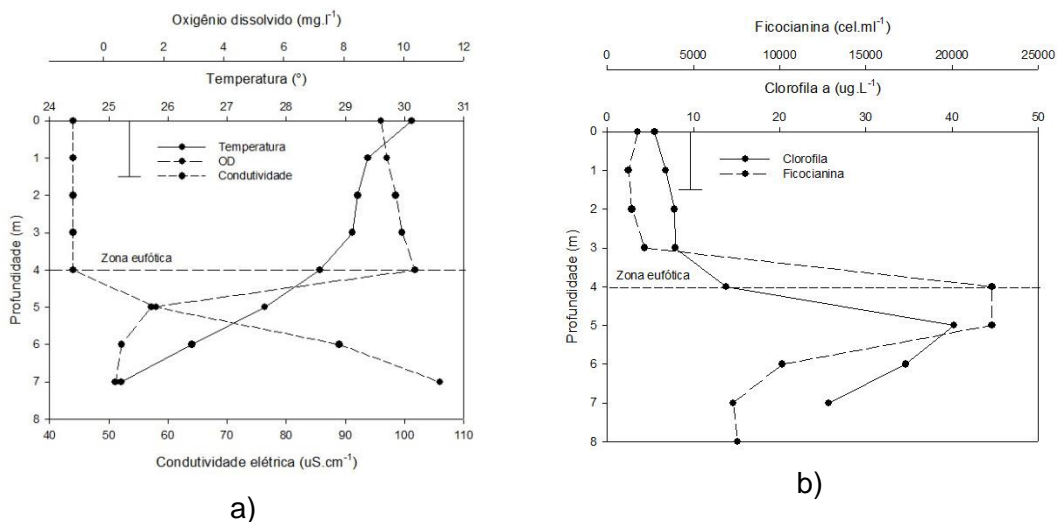


Figura 9: Perfis de temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica (a) e clorofila a e ficocianina (b) na coluna d'água do Lago Terra Alta (Linhares, ES) em 16/04/16 (Oliveira et al., 2016).

2.5. Amostragem do zooplâncton

2.5.1. Amostragem do zooplâncton fluvial

Tendo como base as solicitações de modificações de amostragens da comunidade fitoplanctônica quanto a frequência amostral e número de amostras por estação recomendamos que sejam consideradas os mesmos critérios para comunidade zooplanctônica.

2.6. Amostragem do perifíton

2.6.1. Periodicidade de coleta

A alteração da periodicidade das coletas de mensal para mensal foi baseada em uma gama de trabalhos que conseguiram registrar a variação na estrutura e composição da comunidade perifítica considerando as estações climáticas (inverno, primavera, verão e outono - e.g. Murakami, et al. 2009; Santos et al., 2013; Camargo & Ferragut, 2014; Casartelli & Ferragut, 2015). Ainda, outros estudos conseguiram avaliar a variação da comunidade em uma periodicidade maior (semestral - Gaiser et al., 2006; Carapunarla et al., 2014), mesmo em estudos resultantes de projetos de longa duração (Dunck et al. 2015) ou com coletas anuais (Algarte et al., 2016). Dessa forma, a periodicidade mensal é eficiente para atingir os objetivos do presente estudo.

2.6.2. Substratos

Devido à distribuição espacial dos substratos ao longo das estações amostrais não serem constantes ao longo de um rio (Vannote et al., 1980), foi sugerido uma ordem de escolha de substrato de acordo com a presença deles. Dessa forma, sempre que possível será coletado seixos (rochas) que serão o substrato padrão. Mas na ausência destes, serão coletados outros substratos de acordo com a ordem apresentada.

Fixação das amostras: a fixação das amostras com a solução de Transeau não tem sido a

mais utilizada nos estudos da comunidade perífita, e, portanto, foi sugerida a alteração para a solução formalina 4% (Bicudo & Menezes, 2005; Almeida & Fernandes, 2012; 2013).

2.6.3. Peso seco e peso seco livre de cinzas

Quanto à inclusão da análise do peso seco e do peso seco livre de cinzas se justifica pela análise da representatividade de material orgânico (proveniente no perifiton principalmente de algas) e do material inorgânico, que pode ter proveniência do rejeito da barragem.

2.7. Amostragem de macrófitas aquáticas

A abordagem da coleta de dados aqui empregada será a destrutiva, ou seja, haverá a coleta do material botânico para que sejam diagnosticados os aspectos de riqueza e composição das macrófitas aquáticas (angiospermas e plantas vasculares sem sementes). Sendo assim, a sugestão da alteração da periodicidade das coletas, originalmente quinzenais no TR, para mensais (12 meses de execução) baseia-se no entendimento de espaço de tempo mínimo para regeneração populacional sem que haja interferências tendenciosas. Neste primeiro momento, a amostragem dos 08 pontos sugeridos no TR para coleta de dados demandará periodicidade menor devido à necessidade de produção de informações a respeito da riqueza e da composição da flora de macrófitas aquáticas.

Coletas de material botânico: Angiospermas e plantas vasculares sem sementes só podem ser identificadas em nível específico quando as mesmas apresentam estruturas reprodutivas. Além disso, por se tratarem de plantas que possuem adaptações ao ambiente aquático, as mesmas apresentam estruturas bastante delicadas e, quando da herborização, muitas dessas características podem ser perdidas ou não-observáveis a posteriori. Sendo assim, o cuidado com o armazenamento dessas estruturas à parte em recipientes isolados facilita o processo de determinação taxonômica.

Métodos de coleta: A amostragem com o método do quadrado é recomendada para a finalidade a que se propõe o TR, no entanto, foi adicionado mais um lançamento do quadro amostral (originalmente três e aqui sendo proposto quatro lançamentos).

Referências bibliográficas

- Algarte, V.M., Dunck, B., Leandrini, J.A. & Rodrigues, L. 2016. Periphytic diatom ecological guilds in floodplain: Ten years after dam. *Ecological Indicators*, 69: 407-414.
- Almeida, S.Z. & Fernandes, V.O. 2013. Effects of intensive fish-farming and domestic wastewater on the periphytic algal community in a tropical coastal lagoon (Juara, Brazil). *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 35: 335-342.
- Almeida, S.Z. & Fernandes, V.O. 2012. Periphytic algal biomass in two distinct regions of a tropical coastal lake. *Acta Limnologica Brasilensia*, 24: 244-254.
- APHA – American Public Health Association. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st edition. APHA, Washington, DC.
- Battarbee, R. W.; Jones, V.; Flower, R. J.; Cameron, N.; Bennion, H.; Carvalho, L. & Juggins, S. 2001. Diatoms. In: Smol, J. P; Birks, H. J. B.; Last, W. M. (ed.). *Tracking environmental change using lake sediments*. London: Kluwer Academic Publishers.v.3.

p. 155-203.

- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., May, T.W. et al. 2007. Biomonitoring of lead, zinc, and cadmium in streams draining lead-mining and non-mining areas, Southeast Missouri, USA. *Environmental Monitoring and Assessment* 129: 227.
- Bicudo, C.E.M.; Menezes, M. 2005. *Gêneros de Algas continentais do Brasil* (Chave para identificação e descrições). São Carlos, Ed. Rima.
- Biggs, B.J.F. & Kilroy, C. 2000. Stream periphyton monitoring manual. New Zealand, Niwa.
- Bozelli, R. L., F. A. Esteves, et al. (1992). Padrões de funcionamento das lagoas do Baixo Rio Doce: variáveis abióticas e clorofila-a (Espírito Santo - Brasil). *Acta Limnologica Brasiliensis* 4: 13-31.
- Camargo, V.M. & Ferragut, C. 2014. Estrutura da comunidade de algas perifíticas em *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult (Cyperaceae) em reservatório tropical raso, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea*, 41:
- Casartelli, M.R. & Ferragut, C. 2015. Influence of seasonality and rooted aquatic macrophytes periphytic algal community on artificial substratum in a shallow tropical reservoir. *International Review of Hydrobiology*, 100: 1-11.
- Carapunarla, L., Baumgartner, D. & Rodrigues, L. 2014. Community structure of periphytic algae in a floodplain lake: a long term study. *Acta Scientiarum: Biological Science*, 36: 147-154.
- DeNicola, D.M. & Lellock, A.J. 2015. Nutrient limitation of algal periphyton in streams along an acid mine drainage gradient. *Journal of Phycology*., 51: 739–749.
- Dunk, B., Scheneck, F. & Rodrigues, L. 2015. Patterns in species and functional dissimilarity: insights from periphytic algae in subtropical floodplain lakes. *Hydrobiologia*. DOI 10.1007/s10750-015-2379-x.
- Fernandes, V.O. Variação temporal da estrutura e dinâmica da comunidade perifítica em dois tipos de substrato na Lagoa Imboassica, Macaé (RJ). 1997. 198 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.
- Ferragut, C., Bicudo, D.C. & Vercellino, I.S. 2013. Amostragem e medidas de estrutura da comunidade perifítica. In: A. Schwarzbald, A. Burliga & L.C. Torgan (eds.). *Ecologia do perifiton*. Rima, São Carlos, 157-177 pp.
- Gaiser, E.E., Childers, D.L., Jones, R.D., Richards, J.H., Scinto, L.J. & Trexler, J.C. Periphyton responses to eutrophication in the Florida Everglades: Cross-system patterns of structural and compositional change. *Limnology and Oceanography*, 51: 617-630.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S. & Ohnstad, M. A. M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. 2a ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications. International Biological Program.
- Gonçalves, M. A., F. C. Garcia, et al. (2016). Morphometry and mixing regime of a tropical lake: Lake Nova (Southeastern Brazil). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88(3): 1341-1356.
- Hakanson, L. & Jansson, M. (2002). *Principles of lake sedimentology*. The Blackburn Press, 316p.
- Hill, B.H., Willingham, W.T., Parrish, L.P. et al. 2000. Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia* 428: 161.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & Le-Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting.

- Hydrobiologia* 11: 143-170.
- McCauley, J.R. & Bouldin, J.L. 2016. Cadmium Accumulation in Periphyton from an Abandoned Mining District in the Buffalo National River, Arkansas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96: 757.
- Murakami, E.A., Bicudo, D.C. & Rodrigues, L. 2009. Periphytic algae of the Garças Lake, Upper Paraná River floodplain: comparing the years 1994 and 2004. *Brazilian Journal of Biology*, 69: 459-468.
- Reynolds, C. S. (1997). On the vertical distribution of phytoplankton in the middle Rio Doce Valley lakes. In: Tundisi, J. G. and Saijo, Y. (eds.). *Limnological studies on the Rio Doce valley lakes, Brazil*. São Paulo, Brazilian Academy of Sciences / Center for Water Resources and Applied Ecology - USP,,: 227-242.
- Oliveira, F.B de (2016). Fitoplâncton do lago Terra Alta, Linhares, ES: dinâmica espaço-temporal e relação com a piscicultura. 2016. *Trabalho de Conclusão de Curso*. (Graduação em Ciências Biológicas), Faculdades Integradas São Pedro, Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo
- Santos, T.R., Ferragut, C. & Bicudo, C.E.M. 2013. Does macrophyte architecture influence periphyton? Relationships among *Utricularia foliosa*, periphyton assemblage structure and its nutrient (C, N, P) status. *Hydrobiologia*, 714: 71-83.
- Sartory, D.P. & Grobbelaar, J.E. 1984. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, 114:177-187.
- Schwarzbold, A., Burliga, A.L. & Torgan, L.C. 2013. *Ecologia do Perifiton*. São Carlos, Rima. 413p.
- 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. 1996. p. 3-30.
- Uehlinger, V. 1964. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences* 17: 121-123.
- Utermohl, H. 1958. Zur Vervollkommenung der quantitative phytoplankton: metodik. *Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-38.
- Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell, J.R. & Cushing, C.E. 1980. The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 27: 130-137.
- Wetzel, R.G. 1990. Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators. *Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie*, 24, p. 6-24.
- Wetzel, R.G. 1983. Opening remarks. In: Wetzel, R.G. (Ed.). *Periphyton of freshwater ecosystems*. The Hague, Dr. W. Junk Publishers, p. 339-346.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. New York, Academic Press.

COORDENAÇÃO TÉCNICA

Pesquisador	Instituição	Área temática	E-mail
Alex Cardoso Bastos, Dr.	Depto de Oceanografia e Ecologia - UFES	Coordenador Técnico da RRDM	alexcardosobastos@gmail.com
Anderson Alves Araújo, Dr.	CEUNES - UFES	Macrófitas Aquáticas	sapotae@gmail.com
Alessandra Delazari Barroso, Dra.	FAESA	Fitoplâncton	delazaribarroso@gmail.com
Bjorn Güecker, Dr./Iola Boechat, Dra.	Depto de Geociências - UFSJ	Limnologia Lipídeos e isótopos	guecker@ufsj.edu.br iboechat@ufsj.edu.br
Eneida Maria Eskinazi Santana, Dra.	ICEB - UFOP	Zooplâncton	eskinazi@iceb.ufop.br
Gilberto Fonseca Barroso, Dr.	Depto de Oceanografia e Ecologia - UFES	Limnologia Coordenador Técnico do sistema dulcícola	Gilberto.barroso@ufes.br
Valéria Fernandes, Dra.	Depto de Biologia - UFES	Perifíton	valeriaufes@yahoo.com.br

Gilberto Fonseca Barroso, Ph.D.
Laboratório de Limnologia e Planejamento Ambiental
Departamento de Oceanografia e Ecologia
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Universidade Federal do Espírito Santo
Av. Fernando Ferrari, nº 514, Vitória, ES, Brasil
CEP 29075-910
Tel. 55 27 4009-2744 Fax 55 27 4009-2500
E-mail: ggilberto.barroso@ufes.br

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

1. EQUIPE TÉCNICA – COORDENADORES DOS SUB-PROJETOS

Nome	Função	Instituição
Fabian Sá	Coordenador	UFES
Alex Cardoso Bastos	Pesquisador	UFES
Renato Rodrigues Neto	Pesquisador	UFES
Valeria da Silva Quaresma	Pesquisador	UFES
Luiz Fernando Loureiro	Pesquisador	UFES
Camilo Dias Jr	Pesquisador	UFES
Renato David Ghisolfi	Pesquisador	UFES
Ana Bonecker	Pesquisador	UFRJ
Leila Longo	Pesquisador	UFRB
Rodrigo Leão de Moura	Pesquisador	UFRJ
Gilberto Amado Filho	Pesquisador	JBRJ

2. ESCOPO

Avaliação e Monitoramento biológico e da qualidade de água e sedimentos da área marinha/estuarina definida no Anexo 3 do TR 4. O estudo de avaliação envolve a análise dos habitats marinhos e o potencial impacto derivado do desastre. O monitoramento se refere ao acompanhamento de medidas específicas nos ambientes estuarino e marinho em periodicidades amostrais mensal, trimestral e semestral, sendo esta periodicidade adaptável ao longo do tempo.

O estudo engloba:

1) Monitoramento mensal de 11 estações na plataforma continental adjacente à foz do Rio Doce. A malha amostral e os parâmetros a serem analisados aumentam com a diminuição da periodicidade, conforme o Anexo 3. O monitoramento trimestral engloba 34 estações (Vitória ao limite norte do estado do ES) e o monitoramento semestral envolve 41 estações entre Guarapari (ES) e Abrolhos (BA). As coordenadas destas estações estão em planilha em anexo.

2) Coleta e análise de água e sedimento para parâmetros sedimentológicos, físicos e geoquímicos (Material Particulado em Suspensão, Granulometria, Mineralogia, Metais, Nutrientes e Compostos Orgânicos, Temperatura, Salinidade, Turbidez, entre outros) em associação com parâmetros hidrobiológicos (e.g., composição, estrutura e dinâmica das comunidades planctônicas e bentônicas a partir de coletas periódicas). Estas coletas seguem a periodicidade e as análises definidas no Anexo 3 para os ambientes estuarino e marinho. Este Programa de Monitoramento tem por objetivo monitorar os índices de contaminação/poluição de metais para os ambientes afetados e para entender variações inter-anuais e o comportamento da pluma fluvial e seu impacto na comunidade biológica.

3) Monitoramento das condições oceanográficas através da instalação de um sistema de boias e linhas de fundeio na plataforma continental, distribuídas quanto a profundidade e distância da foz para que sejam medidos parâmetros de forçantes oceanográficas (e.g., correntes, ondas e estrutura da coluna de água), material particulado em suspensão, hidroquímica de material dissolvido, tamanho do material particulado em suspensão, temperatura e salinidade da água, fluorescência, etc. A posição dos pontos de fundeio segue o que está definido no Anexo 3 e na nota técnica da CTBio. Será um total de 4 pontos de fundeio. O objetivo desta ação é investigar/medir o padrão de dispersão da pluma do Rio Doce, possibilitando assim, uma amostragem contínua e que represente diversos cenários meteo-oceanográficos.

- 4) Mapeamento dos Habitats Marinhos a partir de imageamento acústico do fundo marinho, imageamento real por vídeo transects e testemunhagem para definição da espessura do material de rejeito depositado. Avaliar o impacto nos habitats marinhos com levantamentos trimestrais por vídeo.
- 5) Monitoramento e avaliação do impacto em fundos recifais, rodolitos e macroalgas a partir de análises trimestrais e instalação de sensores e placas de incrustação. Os pontos de monitoramento estão definidos no Anexo 3 (planilha em anexo) e poderão ser alterados de acordo com o resultado do mapeamento de habitats, seguindo a devida autorização dos responsáveis. O objetivo é avaliar ao longo do tempo o impacto nos fundos recifais, rodolitos e macroalgas na plataforma adjacente a foz do Rio Doce.
- 6) Modelagem numérica com o modelo ROMS (Regional Ocean Modeling System) associado ao módulo biogeoquímico PISCES para avaliar o impacto na porção biológica, geológica e química do ambiente marinho receptor final do rejeito.
- 7) Monitoramento por imagem de satélite a partir de sensores de Temperatura da Superfície do Mar, cor verdadeira do oceano e concentração de clorofila-a, visando acompanhar, sinoticamente, a evolução temporal das feições térmicas, da pluma de sedimentos e dos efeitos na porção fitoplanctônica da cadeia trófica.
- 8) Ação emergencial para registrar eventos extremos na foz do Rio Doce. Em casos e eventos extremos como grandes picos de cheia deverá haver coleta e de dados dentro da malha mensal de pontos ou em outros pontos caso seja necessário. Esta definição deverá estar de comum acordo com os envolvidos, Fundação Renova e Órgãos Ambientais.

3. METAS

META 1 – Levantamento Mensal: Coleta em 11 estações na plataforma continental adjacente à foz do Rio Doce para caracterização da variabilidade interanual do sistema dulcícola-costeiro-marinho. Nestas estações deverão ser medidos os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), biomassa de plâncton (ictio, fito e zooplâncton), e sedimento de fundo (química e sedimentologia);

META 2 - Levantamento Trimestral: As coletas serão realizadas em 34 estações com análises de parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), quali-quantitativo de plâncton, macroalgas e rodolitos e sedimento de fundo (bentos, química e sedimentologia);

META 3- Levantamento Semestral: As medições semestrais deverão ocorrer nos mesmos pontos mensais e trimestrais, adicionando-se as estações em Abrolhos e em Guarapari. Nessas estações deverão ser medidos os mesmos parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), quali-quantitativo de plâncton, e sedimento de fundo (bentos, química e sedimentologia) acrescidos dos parâmetros de ecotoxicidade descritos no Anexo 1;

META 4 - Medições contínuas: Fundeios em 4 (quatro) pontos, com medições de parâmetros físicos como ondas e correntes, turbidez, temperatura, salinidade e fluorescência ao longo da coluna d'água;

META 5 – Mapeamento e Monitoramento de Habitats e de Acúmulo do Rejeito: Mapeamento geológico e biológico de 3 principais habitats da plataforma adjacente à foz do Rio Doce (recifes, lama e rodolitos) com um monitoramento por vídeo em frequência trimestral. Levantamento geofísico e coleta de testemunhos para determinação da espessura dos depósitos de rejeito e sua extensão;

META 6 - Fundos de Rodolitos e Recifais: Monitorar os fundos recifais e as áreas de rodolitos e macroalgas. Instalação de sensores de temperatura e turbidez nos fundos de rodolitos da APA Costa das Algas, instalação de placas do tipo CAU para monitoramento e evolução de organismos incrustantes. Fundos recifais serão monitorados trimestralmente com imageamento por foto quadrado, medição de temperatura e turbidez, instalação de armadilhas de sedimento;

META 7 - Levantamentos Emergenciais – Levantamento emergencial em função de eventos episódicos importantes, como cheia do rio Doce (pode ser definido pelo controle de cheias ou nível d'água na Bacia), outro desastre e eventos meteorológicos de significância (a ser definido). Serão coletados os parâmetros previstos nos levantamentos mensais.

4. 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>
Planilhas com laudos de todos os parâmetros a serem coletados e medidos. O detalhamento dos dados brutos é apresentado no plano de trabalho de cada sub-projeto	Toda Equipe

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
O projeto do Anexo 3-Marinho terá uma análise individual descritiva para cada sub-projeto e uma análise integrada discutindo a influência dos parâmetros abióticos nos parâmetros bióticos e como esta relação pode indicar os efeitos do impacto da lama de rejeito no ambiente e na biodiversidade marinha. O mapeamento de habitats permitirá uma caracterização da paisagem submarina, o que permite uma análise espacial do impacto.	Toda Equipe

5. METODOLOGIA

As metodologias de coleta e análise dos dados está descrita em cada plano de trabalho individual.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: HIDROGEOQUÍMICA MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Renato Rodrigues Neto	Coordenador	UFES
Fabian Sá	Pesquisador	UFES
Rubens Figueira	Pesquisador	USP
Marco Grassi	Pesquisador	UFPR
Cesar de Castro Martins	Pesquisador	UFPR
Profissional Doutor II	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFPR
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFPR
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFPR
Profissional Júnior	Pesquisador	UFPR
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

Este subprojeto tem como escopo monitorar componentes químicos que são possíveis poluidores ou indicadores ecológicos no estuário do Rio Doce e região adjacente, na APA Costa das Algas, Costa Norte e Sul do ES e Parque Nacional de Abrolhos.

Anteriormente, foi elaborado uma proposta de eliminação de algumas análises químicas, uma vez que não contribuiriam de forma significativa para o monitoramento marinho, tanto como parâmetro indicador como acessório do impacto. Esta justificativa elaborada está no Anexo I deste plano de trabalho.

3. OBJETIVO

Proposta é do monitoramento marinho da foz do rio Doce e zonas adjacentes (Plataforma continental e talude) para os efeitos crônicos dos rejeitos de minério e materiais carreados pela bacia hidrográfica. Isto com base em análises químicas em matrizes sedimentares e aquosas, para avaliar a qualidade ambiental da região.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Análises de Nutrientes

Determinar a concentração de nutrientes em amostras de água e sedimentos a serem coletados na foz do rio Doce e áreas adjacentes coletadas neste projeto conforme malha amostra do anexo 3, visando a sua variação espaço-temporal no sistema.

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 coletadas neste projeto conforme malha amostra do anexo 3. Esta meta busca verificar alterações no aporte dos elementos analisados e sua dinâmica no sistema, relacionando com processos bióticos e abióticos.

Meta 3- Análises de Orgânicos

Realizar as análises de orgânicos em amostras de água e sedimentos a serem coletados na foz do rio Doce e áreas adjacentes coletadas neste projeto conforme malha amostra do anexo 3,

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.

Meta 4- Integração de dados

Esta meta tem como objetivo a integração dos resultados adquiridos nas análises de orgânicos, metais e nutrientes das amostras de água e sedimentos, buscando compreender a distribuição, a variação espaço-temporal e avaliar o potencial impacto causado nas comunidades biológicas.

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>
Nutrientes	Renato Neto
Metais	Fabian Sá
Orgânicos	Renato Neto
Datação de testemunhos	Rubens Figueira
Especiação de metais, mercúrio e emergentes	Marco Grassi
Pesticidas e PCB	Cesar de Castro Martins

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
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 - Análise dos resultados obtidos em comparação com dados pretéritos existentes.	Renato Neto Fabian Sá

6. METODOLOGIA

6.1 Procedimentos para coleta de água e de sedimentos

Procedimento para água marinha

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). As análises que devem ser realizadas nestas amostras são: hidroquímica de metais, orgânicos e nutrientes.

Recipientes para armazenamento das amostras:

Utilizar frascos de polietileno (preferencialmente) ou de vidro, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita, com batoque de vedação (apenas frascos de Vidro) e tampa de rosca. Coletar, em frascos separados:

- 1000 ml de amostras para determinação de metais associado ao material particulado em suspensão e fração dissolvida;
- 1000 ml de amostras para determinação de mercúrio associado ao material particulado em suspensão e fração dissolvida;
- 500 mL de amostra para determinação de metais totais;
- 500mL para determinação de metais dissolvidos.
- 500 mL para determinação de mercúrio total;
- 500mL para determinação de mercúrio dissolvido;

Obs 1: As amostras para análise de mercúrio (Hg) devem ser coletadas separadamente.

Limpeza e descontaminação dos recipientes:

- Rinsar 2 vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido nítrico P.A.;
- 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, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização das garrafas oceanográficas constantes neste manual;
- Certeza do correto funcionamento da garrafa amostradora;
- 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, preservação e conservação das amostras:

Amostras para metais totais:

Deverão ser preservadas pela adição de gotas de solução de ácido nítrico suprapur ou destilado até pH<2 e, em seguida, deverão ser refrigeradas. Em geral, acrescenta-se 1 ml de ácido nítrico PA (suprapur ou destilado) para cada litro de água coletado.

Posteriormente, a refrigeração deverá ser a 4°C e mantida até o momento da análise.

Obs1: A adição de ácido à amostra poderá ser suprimida caso os frascos enviados para coleta já contenham no seu interior o ácido necessário para acidificar a amostra a pH < 2.

Amostras para metais dissolvido e particulado:

Preservar a amostra apenas refrigerada a 4°C até o momento da análise. **NÃO DEVE SER ADICIONADO ÁCIDO NAS AMOSTRAS.**

Obs1: Não encher totalmente os frascos.

Obs2: Com este procedimento apenas de refrigeração das amostras, torna-se necessário que as amostras sejam entregues ao laboratório destinado a realização das análises em um período máximo de 24 horas, a partir do momento da coleta.

Procedimento para sedimento

Deve ser coletado a camada superficial do sedimento (~2cm) com auxílio de uma espátula plástica e acondicionados em potes ou sacos plásticos, sendo posteriormente refrigerados a 4°C até o momento de entrega no laboratório, desde que este período não ultrapasse 24 horas. Caso contrário, as amostras de sedimento devem ser congeladas.

Obs1: Todo o material utilizado na coleta deve ser previamente descontaminado.

6.2 Procedimentos para análise das amostras de água e de sedimentos

METAIS

Metais em água

- Metais totais

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 e EPA 6010C, os quais empregam

técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. Mercúrio será analisado pela técnica de vapor frio associado ao 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 e EPA 6010C, os quais empregam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. Mercúrio será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

- Especificação de metais

A técnica denominada DGT é relativamente recente, tendo sido desenvolvida por Davison e Zhang (1994) para medir quantitativamente espécies metálicas lábeis em sistemas aquáticos naturais, de maneira *in situ*. Nos dias atuais estes dispositivos estão sendo utilizados também em como sedimentos, água intersticial e solos (Davison e Zhang, 1994; Zhang e Davison, 1995, 1999, 2000, 2001).

Os dispositivos DGT permitem a separação das espécies lábeis no local de estudo, a partir do emprego de um hidrogel que age como uma camada difusiva, e da posterior acumulação dos analitos em uma fase ligante. A teoria na qual o DGT se baseia é decorrente das características difusionais das espécies metálicas e de semimetais em um hidrogel e nas propriedades sortivas de uma resina.

No sistema DGT uma camada contendo uma resina de troca iônica (Chelex-100), ou ainda outro material trocador, é separada da solução da amostra de água por um filme fino de uma matriz porosa (hidrogel) de espessura rigorosamente conhecida. O hidrogel controla o fluxo, ou seja, o transporte de massa das espécies no dispositivo. As espécies que se difundem livremente no hidrogel são aquelas que apresentam tamanhos moleculares suficientemente menores que o tamanho de poro do hidrogel. Nesta fase, o transporte das espécies ocorre por difusão molecular, pois o gel polimérico apresenta cerca de 90% de água e permite o movimento livre em escala molecular. As espécies livres e aquelas capazes de se dissociar de complexos metálicos na fase difusiva são acumuladas, por meio da complexação ou troca iônica, em uma resina ou material adsorvente.

Na aplicação deste dispositivo em uma amostra de água, há uma camada de difusão entre sua superfície e a solução. Nestas condições ocorre o transporte dos analitos só por difusão molecular. Em poucos minutos de imersão, é estabelecido um gradiente de concentração linear entre a solução e o hidrogel devido à diferença de concentração dos metais presentes no meio e no sensor, de acordo com a Primeira Lei de Difusão de Fick. O meio de ligação adsorve as espécies que se difundiram no sensor. As espécies lábeis medidas são o íon livre presente na solução ou o íon livre oriundo da dissociação de complexos metálicos, dependendo da estabilidade e da cinética de dissociação destes complexos. Complexos grandes e estáveis tais como os formados entre íons metálicos e substâncias húmicas, assim como os metais associados ao material particulado e colóides, não são capazes de permear a camada difusiva e não contribuem na medida.

Portanto, o dispositivo DGT apresenta a capacidade de discriminar as espécies que sofrem difusão no hidrogel de acordo com a labilidade, com os coeficientes de difusão das espécies e com a cinética de dissociação dos complexos durante o tempo da medida (Gimpel *et al.*, 2003). A Figura que segue mostra a representação esquemática do dispositivo DGT evidenciando seus principais componentes.

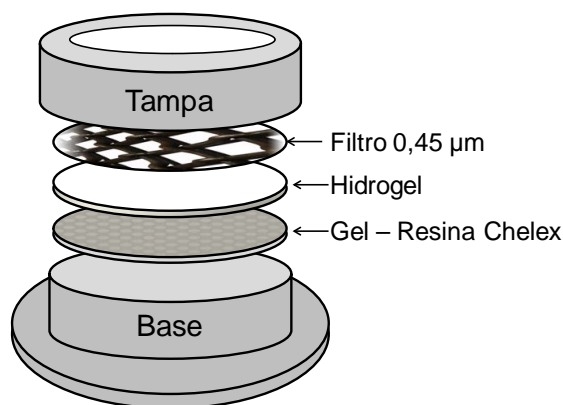


Figura 1. Esquema representativo do dispositivo DGT comercial.

A concentração da espécie metálica acumulada na resina em um tempo adequado pode ser determinada por uma técnica instrumental depois de uma etapa de eluição ácida (Zhang e Davison, 1995). Da maneira que ocorre a acumulação das espécies no DGT e o processo de extração dos analitos, que envolve a utilização de pequenos volumes de solução ácida, pode-se estabelecer um sistema de pré-concentração de espécies de interesse. De acordo com Zhang e Davison (1995), a aplicação do DGT durante um dia no ambiente aquático pode resultar em um fator de concentração de aproximadamente 300 vezes. Tal situação permite realizar medidas em concentrações bastante baixas, na ordem de pmol L^{-1} . Esse processo de pré-concentração apresenta duas vantagens. A primeira refere-se ao aumento de sensibilidade que proporciona a detecção de concentrações bastante reduzidas de espécies lábeis. O segundo aspecto está relacionado com o fato que ocorre a extração da espécie de interesse da matriz, minimizando interferências nas medidas.

Para realização das medidas, os dispositivos são montados em laboratório, transportados para o campo, onde são aplicados por um período de tempo adequado. Em seguida são recolhidos, desmontados e a camada adsorviva é submetida a uma eluição com solução ácida, sendo em seguida realizada a determinação das espécies por uma técnica analítica instrumental adequada, como por exemplo a espectrometria de emissão ótica em plasma acoplado indutivamente (Chostak et al, 2015).

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 $0,45\mu\text{m}$. O material retido pela membrana será caracterizado quanto a sua composição geoquímica através das análises descritas abaixo. Mercúrio será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

- **Metais parciais**

Na membrana saturada pelo MPS será adicionado 10ml de HNO_3 destilado (sub-boiling) e aquecidas em forno micro-ondas (EPA 3051A). Após o término do período de digestão ácida, as amostras serão filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

- **Terras Raras**

A decomposição das amostras de MPS para análise de elementos terras raras será realizada pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (sub-boiling), HNO_3 destilado (sub-boiling) e H_2O_2 (Merck). Na membrana saturada pelo MPS será adicionado 10ml desta mistura de reagentes e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras serão filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

Metais em sedimentos

- **Metais totais**

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), HNO_3 destilado (sub-boiling) e H_2O_2 (Merck). 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 serão filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A). Mercúrio será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

- **Metais parciais**

Para análise de metais parciais será utilizado o método EPA 3051A (Extração parcial). 0,25g de sedimento será liofilizado e macerado (gral e pistilo de ágata), sendo adicionado 10ml de HNO_3 destilado (sub-boiling) e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras serão filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

- Extração sequencial de metais

Análise de metais nas diferentes frações presentes nos sedimentos será realizada através da extração sequencial proposta por Tessier et al., (1979) ou o proposto no método BCR (Tabela 1). Este método propõe a quantificação de metais presentes em 4 a 5 frações distintas obtidas pela eluição sequencial de uma mesma amostra sedimentar (Tabela 4). Os metais nos diferentes extratos obtidos serão quantificados em ICP-MS (EPA 6020A). Mercúrio será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS. Ressalta-se que as frações F1 e F2 são obtidas (suprimidas) em um único extrato no método BCR, sendo, portanto, 4 frações ao final.

Tabela 4 - Comparação entre as diferentes frações obtidas pelo método de extração sequencial proposto por Tessier *et. al.* (1979) e método BCR.

Frações	Método de extração sequencial Tessier <i>et al.</i> (1979)	Componentes sedimentares extraídos Tessier <i>et al.</i> (1979)	Frações	Método de extração sequencial BCR	Componentes sedimentares extraídos BCR
F1 - Trocável	1 M MgCl ₂ , pH 7, 1 h	Íons trocáveis			
F2 Adsorvida/Carbonática	– 1 M NaOAc, pH 5 (HOAc), 5 h	Íons adsorvidos, carbonatos	F1 - Solúvel em ácido	0,11 M HOAc, 16 h	Íons trocáveis e carbonatos
F3 - Redutível	0,04 M NH ₂ OHHCl in 25% (v/v) HOAc, 6 h, 96°C	Óxidos de ferro e manganês	F2 - Redutível	0,1 M NH ₂ OHHCl, pH 2 (HNO ₃), 16 h	Óxidos de ferro e manganês
F4 - Sulfídica/Orgânica	30% H ₂ O ₂ , pH 2 (HNO ₃), 5 h at 85°C, extracted with 3,2 M NH ₄ OAc em 20% HNO ₃ (v/v), 0,5 h	Sulfetos/Orgânicos	F3 - Oxidável	30% H ₂ O ₂ , pH 2 (HNO ₃), 2 h a 85°C, extraído com 1 M NH ₄ OAc pH 2 (HNO ₃), 16 h	Sulfetos/Orgânicos
F5 - Residual	HF – HNO ₃ – H ₂ O ₂	Metais ligados em minerais litogênicos	F4 - Residual	Aquecimento HF/HNO ₃ concentrado.	Metais ligados em minerais litogênicos

- 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*), HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e H₂O₂ (Merck). Na membrana saturada pelo MPS será adicionado 10ml desta mistura de reagentes e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras serão filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato será realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

ORGÂNICOS

Serão 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 foram modificados em função do aporte do material de rejeito, serão determinados biomarcadores lipídicos tais como: triterpenóides, hopanóides, ácidos graxos, entre outros. A fim de avaliar o aporte de material oriundo de efluentes domésticos e industriais serão determinados esteróis, pesticidas, bifenilas policloradas (PCB), fenóis e contaminantes emergentes, tais como fármacos e outros. 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.

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

As amostras recebidas após as campanhas de coleta serão armazenadas refrigeradas (amostras de água) e em freezer (amostras de sedimento) até os procedimentos laboratoriais para a determinação de hidrocarbonetos. Amostras de sedimento recebida serão 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 serão baseadas nos protocolos EPA 3510C - Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction, EPA 3540c - Soxhlet Extraction (USEPA, 1996), EPA 8270d - Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (USEPA, 2007). Amostras de água (1 L) serão extraídas em funil de separação com hexano (50 mL x 3) e o extrato bruto submetido a fracionamento em coluna cromatográfica por adsorção com sílica gel e alumina conforme a ser descrito também para as amostras de sedimento. Aproximadamente 10 g de sedimento liofilizado e 2 g de cobre ativado para a remoção de enxofre molecular serão adicionados em cartuchos de celulose e extraídos em Soxhlet (12 h / 250 mL de diclorometano). A fim de verificar a eficiência de extração serão 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 (calcinada a 450 °C / 4 h e desativada com 2 % m/v de ultra pura 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. Aliquotas das frações F1 e F2 foram reunidas e injetadas para a determinação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Para a quantificação de biomarcadores como terpanos, 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 x 0.250 mm x 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP será preparada a partir de um mix padrão de alcanos (n-C₈

– C₄₀) na faixa de concentração de 0,5 a 50,0 µg / mL com padronização interna (n-C_{16d} – 10 µg / mL). A determinação quantitativa de HTP será feita pela integração da área total dos cromatogramas, englobando toda a fração resolvida e não-resolvida através da determinação da linha de base, descontando-se as áreas dos picos dos padrões. A programação de temperatura 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 02. Os HPA serão 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 serão utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. Os demais compostos identificados serão 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 5 - 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 serão 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, serão realizadas análises de amostras de sedimento certificado de referência (Standard Reference Material NIST 1941b).

- **Pesticidas clorados e bifenilas policloradas (PCB)**

Os sedimentos serão processados conforme método analítico descrito em UNEP (1992). Aproximadamente 100g de sedimento são secos em um liofilizador, desagregados utilizando almofariz e pistilo de porcelana,

homogeneizados e armazenados em frascos de vidro. Durante as análises, aproximadamente 20g de sedimento seco são adicionados 100µL de uma mistura de padrões subrogados para a determinação de compostos organoclorados (PCB 103 (C-103N) e PCB 198 (C-198N), AccuStandard, USA). Posteriormente, extraídos em aparato Soxhlet durante 8 h com 80 mL de n-hexano e diclorometano (1:1) (J. Baker, México). Os extratos são concentrados a 2 mL e submetida à purificação por cromatografia de adsorção em coluna de alumina, com eluição de 15mL de uma mistura 30% diclorometano em n-hexano para a obtenção da fração contendo os compostos organoclorados. Os extratos resultantes são então concentrados a aproximadamente 500 µL.

Os PCB e pesticidas organoclorados serão identificados e quantificados em um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies 7890A acoplado a espectrômetro de massas e injetor automático, conforme USEPA 8081b e USEPA 8082. A coluna capilar utilizada será com as seguintes características: fase estacionária de 5% fenil-metil-siloxano, 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme. A injeção de 1µL do extrato da amostra será em modo sem divisão de fluxo (*splitless*). A programação de temperatura do forno tem início em 100°C (1min) com aumento à taxa de 5°C min⁻¹ até 140°C (1min), aumentando a 1,5°C min⁻¹ até 250°C (1min) e 10°C min⁻¹ até 300°C permanecendo isotérmico por 5 min. A temperatura do injetor mantida a 300°C.

As amostras de sedimento superficial serão analisadas para Alfa-HCH (BHC), Beta-HCH (BHC), Gama-HCH (BHC), Delta-HCH (BHC), DDT (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), DDE (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), DDD (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), dieldrin, endrin, Alfa-clordano, Gama-clordano e o somatório de 7 congêneres de PCBs (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) em sua fração total, conforme na Tabela III do Anexo da Resolução CONAMA 454/12. A identificação dos pesticidas clorados e PCBs será baseada nos tempos de retenção de padrões autênticos.

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

- **Éter-aminas e aminas aromáticas**

Amostras de sedimento liofilizado (10 g) fortificados com trifetilamina são extraídas com diclorometano por sonicção (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.

- **Contaminantes Emergentes**

A determinação de contaminantes emergentes é comumente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas, empregadas após uma etapa de extração, seguida de uma outra de purificação do extrato. Uma das formas mais eficientes de se realizar a extração consiste na utilização da técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). O cartucho precisa ser condicionado, em seguida é feita a extração dos compostos de interesse presentes em um dado volume da amostra. Por fim, os analitos retidos no cartucho de SPE são eluídos utilizando-se um solvente apropriado. O excesso de solvente é evaporado e em seguida um dado volume desta solução é injetado no cromatógrafo.

- **Fenóis**

Amostras de água serão analisadas conforme metodologia EPA EPA SW 846 8270D EPA SW 846 3500C.

ELEMENTAR

- **Carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e enxofre.**

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, N, P, S) nos sedimentos deste estudo serão realizadas após a descarbonatação, através da adição de HCl 1,0 mol L⁻¹ diretamente nas amostras dentro dos frascos de análises. Este procedimento será 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) será realizada com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando um analisador elementar (Euro Vector EA3000). Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico foram realizados com padrão certificado.

ISÓTOPOS

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

Isótopos estáveis: Na avaliação do aporte orgânico para os sedimentos da região costeira, a amostra será descarbonatada com o uso de HCl 10%, lavada com água ultrapura e centrifugada para a remoção do sobrenadante. O residual será 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 será 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 ¹³C/¹²C ou ¹⁵N/¹⁴N.

- **Isótopos ²¹⁰Pb/¹³⁷Cs e taxa de sedimentação**

A determinação de ²¹⁰Pb será realizada a partir da medida da emissão de seus raios gama, da ordem 47 keV. O efeito da auto-absorção, devido a emissões menores de 100 keV deve ser levado em consideração, para isso, em cada amostra analisada será realizado um cálculo do fator de auto-absorção, parâmetro este utilizado no cálculo da atividade final do ²¹⁰Pb. Assim a atividade do ²¹⁰Pb é calculada pela equação 1:

$$A_{\text{Pb-210}} = \frac{(C \times F) - BG}{t \times m \times p_{\gamma} \times \varepsilon}$$

em que,

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

C é o número de contagens do ²¹⁰Pb na amostra;

F é o fator de auto-absorção;

BG é o número de contagens da radiação de fundo na região do ²¹⁰Pb (47 keV);

t é o tempo de contagem da amostra, em segundos;

m é a massa da amostra, em quilogramas;

p_{γ} é a probabilidade de emissão da radiação gama proveniente do ²¹⁰Pb igual a 0,0418;

ε é a eficiência do detector.

A atividade de ¹³⁷Cs por espectrometria gama é obtida por meio da Equação 3:

$$A_{Cs-137} = \frac{C - BG}{t \times m \times p_{\gamma} \times \varepsilon}$$

em que,

A_{Cs-137} é a atividade do ^{137}Cs na amostra (Bq.kg^{-1});

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

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

t é o tempo de contagem da amostra, em segundos;

m é a massa da amostra, em quilogramas;

p_{γ} é a probabilidade de emissão da radiação gama proveniente do ^{137}Cs igual a 0,850;

ε é a eficiência do detector.

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

NUTRIENTES DISSOLVIDOS (SOMENTE EM ÁGUA)

- **Ortofosfato, nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal e silício reativo dissolvido**

Análises de nutrientes dissolvidos serão realizadas pelo meio de análise de fluxo contínuo ("Continuous Flow Analysis" - CFA), com o uso de um Seal Autoanalyzer (AA3), o qual possui métodos certificados pela USEPA.

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

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

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

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

- Nitrogênio Amoniacal: O método utilizado será uma modificação do procedimento de Koroleff (1969, 1970). O nitrogênio amoniacal será analisado via reação de Berthelot, no qual o ácido hipocloroso e fenol reagem com a amônio em uma solução alcalina para formar o azul de indofenol. A amostra é passada por uma célula de 10 mm e a absorbância medida a 660 nm.

- **Nitrogênio e fósforos totais.**

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

- **Especiação de fósforo (P)**

Com a premissa de verificar o carreamento de compostos fosfatados por toda a bacia hidrográfica do rio Doce pela lama de rejeitos de minério e aportados na plataforma continental, serão realizadas análises de fosfato em diferentes matrizes sedimentares.

O método utilizado é descrito por Anschutz e Deborde (2016) e consiste em uma extração sequencial para a mensuração de fósforo em água intersticial P-trocável, P-ligado a ferro, P associado a apatita biogênica, P associado apatita autigênica e carbonato, P associado apatita detrital e formas inorgânicas e P orgânico.

As etapas de extração são descritas na tabela abaixo e cada extrato analisado por colorimetria segundo Murphy e Riley (1962) (Tabela 6):

Tabela 6 - Etapas de extração e cada extrato a ser analisado por colorimetria segundo Murphy e Riley (1962)

Fração extraída	Extrator (tempo)	Reação química
P-trocável	NaHCO ₃ + H ₂ O + tolueno 3x24h	Desorção sem atividade bacteriana em água artificial
P-ligada a ferro(III) amorfo	Ascorbato (20 g/L) 24h	Redução de óxidos de ferro(III) amorfo e dissociação do P.
P-ligado a ferro(III) cristalino	ditionito citrato bicarbonato 4h	Dissociação de óxido de Fe(III) redutível e P associado.
P-ligado a hidroxiapatita autigênica	NH ₄ Cl (2M) 16h	Dissociação da hidroxiapatita e P associado.
P-ligado a apatita carbonática autigênica	Acetato de Sódio 16h	Dissociação da apática carbonática e P associado.
P-ligado a apatita detrital e carbonato	HCl (1M) 16h	Dissociação ácida de carbonatos e apatita.
P-orgânico	H ₂ SO ₄ (18M) 16h	Dissociação ácida da matéria orgânica.

- **Parâmetros Físico-químicos e biológicos**

pH, ORP, Salinidade, sulfetos totais, alcalinidade, DBO₅ (somente em água), DQO₅ (somente em água), coliformes totais e fecais (somente em água) e *Escherichia coli* (somente em água).

As medições dos parâmetros físico-químicos (pH, ORP, oxigênio dissolvido e sólidos totais dissolvidos) serão realizadas *in-situ* com o auxílio de uma sonda multiparâmetro.

Parâmetros de temperatura, salinidade, pressão, turbidez e fluorescência serão medidos *in-situ* com a utilização de um CTD com fluorímetro e turbidímetro acoplados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- Alzaga, R., Mesas, A., Ortiz, L., Bayona, J.M. Characterization of organic compounds in soil and water affected by pyrite tailing spillage. **Science of The Total Environment**, v. 242, n. 1-3, p. 167–178, dez. 1999.
- Armstrong, F. A. J.; Stearns, C. A.; Strickland, J. D. H. The Measurement of Upwelling And Subsequent Biological Processes by Means of the Technicon Autoanalyzer and Associated Equipment. **Deep-Sea Research**, v. 14, p. 381-389, 1967.
- Bernhardt, H., Wilhelms, A. The continuous determination of low level iron, soluble phosphate and total phosphate with the AutoAnalyzer. **Technicon Symposia**, v. 1, p. 385-389, 1967.
- Chostak, C.L.; Campos, M.S.; Silva, S.B.; Abate, G.; Grassi, M.T. Modified DGT devices using alternative materials for the speciation of trace elements in natural waters. **Quimica Nova**, 38, 356, 2015.
- Davison, W.; Zhang, H. *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, 367, 546, 1994.
- Frémion, F.; Courtin-Nomade, A.; Bordas, F.; Lenain, J.F.; Jugé, P.; Kesten, T.; Mourier, B. Impact of sediments resuspension on metal solubilization and water quality during recurrent reservoir sluicing management. **Science of the Total Environment**, 562 201–215. 2016.
- Gimpel, J.; Zhang, H.; Davison, W.; Edwards, A. C. *In situ* trace metal speciation in lake surface waters using DGT, dialysis, and filtration. **Environmental Science & Technology**, 37, 138, 2003.
- Koroleff, F. Direct determination of ammonia in natural waters as Indophenol Blue. **International Conference of the Exploration of the Sea**, n.9, 1969.
- Murphy, J.; Riley, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- Pourabadehei, M; Mulligan, C.N. Effect of the resuspension technique on distribution of the heavy metals in sediment and suspended particulate matter. **Chemosphere** 153 58-67. 2016.
- Pourabadehei, M; Mulligan, C.N. Resuspension of sediment, a new approach for remediation of contaminated sediment. **Environmental Pollution** 213 63-75. 2016.
- Tessier, A., Campbell, P. G. C., Bisson, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, 51, 844–851. 1979.
- UNEP. United Nations Environment Programme. Determination of petroleum of hydrocarbons in sediments. Reference Methods For Marine Pollution Studies. v. 20, 1992.
- USEPA. **Method 350.1: Determination of Ammonia Nitrogen by Semi-automated Colorimetric**. Disponível em: < <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-3501.pdf>>.
- USEPA. **Method 353.2, Revision 2.0: Determination of Nitrate-Nitrite Nitrogen by Automated Colorimetry**. Disponível em: < https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_353-2_1993.pdf>.
- USEPA. **Method 365.5: Determination of Orthophosphate in Estuarine and Coastal Waters by Automated Colorimetric Analysis**. Disponível em: < https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=309420>.
- USEPA. **Method 366: Determination of Dissolved Silicate in Estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis**. Disponível em: <<http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-366.pdf>>.
- 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>.
- **Method 3500c: Organic Extraction And Sample Preparation. U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3500c.pdf>
- USEPA. **Method 3510c: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3510c.pdf>
- USEPA. **Method 3540c: Soxhlet Extraction. U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>, 1996.
- USEPA. **Method 6010C: Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-6010c.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>
- USEPA. **Method 8082a: Polychlorinated Biphenyls (Pcbs) By Gas Chromatography. U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/8082a.pdf>
- USEPA. **Method 8081b: Organochlorine Pesticides By Gas Chromatography. U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8081b.pdf>
- USEPA. **Method 8270d: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). U.S. Environmental Protection Agency.** Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>, 2007.
- Valderrama, J. C. The Simultaneous Analysis of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Natural Waters. **Marine Chemistry**, v. 10, p. 109-122, 1981.
- Zhang, H.; Davison, W. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurements of trace metals in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, 67, 3391, 1995.
- Zhang, H.; Davison, W. Diffusional characteristics of hydrogel used in DGT and DET techniques. **Analytica Chimica Acta**, 398, 329, 1999.
- Zhang, H.; Davison, W. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. **Analytical Chemistry**, 72, 4447, 2000.
- Zhang, H.; Davison, W. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. IUPAC, **Pure and Applied Chemistry**, 73, 9, 2001.

ANEXO A**JUSTIFICATIVAS REFERENTE AS ANÁLISES QUÍMICAS**

Concordamos que as análises de Colimetria (Coliformes Totais, Coliformes fecais e *Escherichia coli*), demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO) e Tributilestanho (TBT) podem ser excluídas, uma vez que não contribuiriam de forma significativa para o monitoramento marinho, tanto como parâmetro indicador como acessório do impacto.

As análises mantidas têm suas justificativas apresentadas por tópicos referentes a metais e terras raras, nutrientes e orgânicos. As demais análises presentes no TR que não são solicitadas suas retiradas ou mantidas e justificadas, como por exemplo, a datação através da técnica de ^{210}Pb , serão realizadas.

Ressalta-se que no tópico “3.2 – Parâmetros físico-químicos da água” presente no TR, informa em “Recipientes para armazenamento das amostras” que deverão ser utilizados frascos para coleta de amostras para determinação de metais associados ao material coloidal, entretanto a metodologia apresenta os procedimentos para metais e arsênio no material particulado em suspensão (MPS), que ao nosso entendimento é mais condizente com o estudo proposto, uma vez que a obtenção da fração coloidal é muito incerta através da filtração convencional. Desta forma, as amostras coletadas seguirão o procedimento de análise de metais no MPS, como definido na metodologia proposta no plano de trabalho.

ABORDAGEM

A periodicidade e número amostral referente a cada análise foram discutidas e são apresentadas a seguir (Tabela 1). Desta forma, foi considerado, dentro do número total de estações, uma subdivisão em dois grupos menores de estações denominados “prioritárias 1” e “prioritárias 2”. As estações “prioritárias 1” terão tratamento analítico diferenciado, com análises específicas a serem desenvolvidas (além das análises comuns), como por exemplo, extração sequencial e especiação de metais e arsênio, em amostras de sedimento e água, respectivamente. Estas estações “prioritárias 1” estão localizadas, na malha amostral proposta, mais próximas a costa e em dois transectos longitudinais a esta, sendo um na região da foz do Rio Doce e outro em Abrolhos, abrangendo locais de maior deposição da lama de rejeito e de interesse ecológico.

Tabela 1 - Periodicidade de amostragem, número de amostras e parâmetros a serem analisados.

Matriz	Período	Extrações amostrais	Prioritárias 1	Parâmetros/Análises	Prioritárias 2	Parâmetros
Água	Mensal	11	6	Metais dissolvidos	5	Metais dissolvidos
				Metais totais		Metais totais
				Metais MPS		Metais MPS
				Metais especiação (DGT)		Nutrientes
				Orgânicos		Elementar (MPS)
				Nutrientes		
				Elementar (MPS)		
Sedimento		11	6	Metais especiação	5	Metais parciais
				Terras raras		Metais totais
				Orgânicos		Terras raras
				Fósforo especiação		Orgânicos
				Elementar		Elementar
Água	Trimestral	34	13	Metais dissolvidos	21	Metais dissolvidos
				Metais totais		Metais totais
				Metais MPS		Metais MPS
				Metais especiação (DGT)		Nutrientes
				Orgânicos		Elementar (MPS)
				Nutrientes		
				Elementar (MPS)		
Sedimento		34	13	Metais especiação	21	Metais parciais
				Terras raras		Metais totais
				Orgânicos		Terras raras
				Fósforo especiação		Orgânicos
				Elementar		Elementar
Água	Semestral	41	23	Metais dissolvidos	18	Metais dissolvidos
				Metais totais		Metais totais
				Metais MPS		Metais MPS
				Metais especiação (DGT)		Nutrientes
				Orgânicos		Elementar (MPS)
				Nutrientes		
				Elementar (MPS)		
Sedimento		41	23	Metais especiação	18	Metais parciais
				Terras raras		Metais totais
				Orgânicos		Terras raras
				Fósforo especiação		Orgânicos
				Elementar		Elementar

METAIS E ELEMENTOS TERRAS RARAS

Metais E Arsênio

O conhecimento das concentrações de metais e arsênio é imprescindível ao monitoramento da qualidade da água e dos sedimentos em função do rompimento da barragem de rejeito de mineração do Fundão, no município de Mariana, estado de Minas Gerais. Alguns elementos apresentam nítida variação na concentração conforme a proximidade e o aumento da presença dos rejeitos da mineração na região estuarina do Rio Doce, como é o caso dos elementos Fe, Al, Mn, Cr e Zn. Por outro lado, outros elementos apresentam variação na concentração, mas sem uma possível relação direta com a lama de rejeitos, como por exemplo, Ni e As (UFES, 2017).

Pereira, et al. (2008) estudando os efeitos dos rejeitos de minério de ferro em uma lagoa costeira indicam que a mineração e processamento do minério de ferro são fontes potenciais e influenciam

claramente nas concentrações de Fe, Mn, Cu, Cr e Ni. Variações nas concentrações de Fe, Mn e Cu também podem estar associadas a ocorrências naturais na área de mineração, devido ao enriquecimento no depósito de minério de Fe. Por outro lado, através do processo de moagem do minério de ferro pode ocorrer enriquecimento de Cr e Ni nos locais da barragem, devido ao desgaste das bolas de moagem, as quais contêm ligas de Fe-Cr e Fe-Ni.

A realização das análises de metais e arsênio totais e parciais em amostras de água permanecerão em todas as amostras pois já vem sendo desenvolvidas ao longo do monitoramento realizado pela UFES e as concentrações servem como comparativo aos valores orientadores presentes na Resolução CONAMA 357/05. Outra análise mantida é a de metais e arsênio associados ao material particulado em suspensão (MPS), uma vez que a fase particulada é de extrema importância para a compreensão dos processos geoquímicos de adsorção e dessorção destes elementos, além dos processos sedimentares.

A determinação das frações parciais e totais nos sedimentos superficiais é necessária para efeito comparativo com valores estabelecidos em outras pesquisas que antecederam à chegada da lama de rejeitos. As análises de metais e arsênio parciais nos sedimentos superficiais também foram desenvolvidas durante o monitoramento realizado pela UFES, auxiliando, portanto, a compreensão dos possíveis impactos em escalas temporal e espacial.

Nas amostras de sedimento superficial provenientes das estações "prioritárias 1" será realizada a extração sequencial de metais e arsênio. Este procedimento envolve a separação química dos elementos nas frações trocável, redutível, oxidável e residual. A introdução de grande quantidade de óxido de ferro, principal componente da lama de rejeitos, pode alterar a mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade potencial de metais e arsênio no ambiente (CORINGA et al., 2016; ROSA, et al., 2011), sendo a extração sequencial uma importante ferramenta para a compreensão deste tipo de impacto.

Terras raras

A análise de elementos terras raras (ETRs) torna-se importante na relação da composição dos sedimentos com sua possível fonte. ETRs presentes em um determinado sedimento refletem a química de sua fonte, pois são insolúveis e presentes em baixas concentrações na água do mar, sendo transportados principalmente como material particulado. Assim, o único fator mais importante contribuinte para o conteúdo dos ETRs em sedimentos clásticos é a sua procedência.

As variações e razões das concentrações de ETRs, bem como a sua interpretação conjunta com outros metais, foram utilizadas na determinação de assinaturas químicas em minérios de ferro presentes no Quadrilátero Ferrífero (OLIVEIRA et al., 2015). Óxidos de ferro, alumínio e manganês possuem correlações positivas com ETRs, sendo importantes meios transportadores, estando entre os principais atributos em solos e depósitos sedimentares em relação ao teor de ETRs (PAYE, 2014).

Desta forma, a quantificação de ETRs, associada a outros metais, pode elucidar sobre a origem, transporte e sedimentação do material que compõe atualmente os depósitos sedimentares costeiros. Além disso, evidenciar sobre processos de mistura da lama de rejeitos com outros materiais provindos dos solos erodidos ou de sedimentos costeiros depositados anteriormente ao rompimento da barragem de rejeitos da mineração.

NUTRIENTES

Nutrientes dissolvidos nitrogenados (nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal), fosfatados (ortofosfato) e silicosos (silício reativo dissolvido), bem como nutrientes totais (nitrogênio e fósforo) são essenciais para microrganismos planctônicos (fitoplâncton) para a formação celular e amplamente utilizados para avaliar a estrutura dessas comunidades (HECKY; KILHAM 1988; ALONSO-RODRÍGUEZ *et al.*, 1999; SCHMIT *et al.*, 1999; EÇA, *et al.*, 2014). Concomitantemente, elementos traço, especialmente o ferro (Fe), estão associados a limitações de crescimento dos organismos fitoplanctônicos, mesmo em ambientes com elevados níveis de nutrientes dissolvidos relativos (MARTIN *et al.*, 1989; HUTCHINS; BRULAND, 1998; GREGG *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2013). Assim, faz-se necessário o estudo e avaliação dos nutrientes dissolvidos e sua relação com os organismos planctônicos em um evento de elevado aporte de ferro e outros metais, como o caso do desastre de Mariana, pois o distúrbio na concentração dos nutrientes pode causar sérios danos ecológicos.

Além dos efeitos com a comunidade planctônica pela relação de nutrientes e metais (principalmente o Fe), efeitos de produtos utilizados na flotação reversa em barragem de minério, como éter aminas, éter diaminas, aminas aromáticas, amido de milho, etc. (ARAUJO, *et al.*, 2005) podem contribuir para o incremento de nutrientes nitrogenados na bacia do rio Doce e nas regiões marinhas, podendo alterar comunidades de organismos e causar efeitos adversos em humanos caso haja consumo de água com elevadas concentrações desses compostos (JOOSSENS *et al.*, 1996; GREER E SHANON, 2005;

TSUGANE E SASAZUKI, 2007). Impactos diretos aos rejeitos não são os únicos que podem estar relacionados ao incremento de nutrientes no ambiente afetado pelos rejeitos. Impactos indiretos causados pelo carreamento de materiais acumulados na bacia hidrográfica e em barragens ao longo do rio também precisam ser avaliados e contabilizados. Além disso, a sílica, nutriente utilizado principalmente por diatomáceas, é diretamente ligada a rochas, na forma de silicatos, sendo um indicador de água continental. Neste caso específico, pode ser utilizado como um indicador direto da lama que chegou ao estuário e região marinha. É importante mencionar que os primeiros estudos no estuário, mostraram um aumento significativo na concentração dos nutrientes com possíveis alterações ecológicas (UFES, 2017).

Devido ao fato do aporte da lama de rejeitos, rica em óxidos de ferro, poder alterar a disponibilidade e distribuição do fósforo presente no sedimento, sendo este um nutriente importante para a produção primária, a análise de sua especiação faz-se necessária e importante perante a avaliação dos possíveis impactos.

ORGÂNICOS

Aminas, hidrocarbonetos, HPA, ácidos graxos

Muitas são as etapas que envolvem todo o processo de exploração e beneficiamento de minério de ferro. Nestas etapas são utilizados diversos aditivos químicos e inorgânicos. Em particular, podemos citar a etapa de flotação que dispense um intensivo uso de reagentes químicos. Os reagentes de flotação podem ser classificados como coletores, espumantes e modificadores (WILLS e MUNN (2006); PERES *et al.* (2007)]. Dentre os coletores, estes podem ainda ser divididos em duas classes como aniônicos ou catiônicos. Sendo assim, a quantidade de compostos químicos que são utilizados para este fim é imensa, destacando-se o uso de: ácidos carboxílicos/alquil carboxilatos, alquil sulfatos/sulfonatos, alquil hidroxamatos e aminas. Destes citados anteriormente, a classe de compostos mais utilizados para a flotação de minério de ferro é o grupo das aminas, mais especificamente das éter monoaminas e éter diaminas (BULATOVIC, 2007, MONTE e PERES, 2004).

Segundo dados de Batisteli (2007), somente a SAMARCO, consumia cerca de 1500 toneladas de amina por ano em seu Concentrador. Em 2005, a mesma representou aproximadamente 48% dos gastos totais com reagentes. Ainda segundo o autor:

“A expectativa para anos seguintes era de elevação no consumo de amina devido, principalmente, às metas crescentes de produção e à redução dos teores de ferro nos minérios. Sabe-se, ainda, que grande parte dessa amina adicionada ao processo é descartada na polpa do rejeito para as barragens, estando presente na água e adsorvida nas partículas minerais compostas, predominantemente, de quartzo”.

Estudos correlacionando a presença de aminas em área afetadas por acidentes com envolvendo de rejeitos de mineração são descritos na literatura científica. Uma variedade de trifenilaminas bromadas, mono e dicloradas foram identificadas em amostras água superficiais, de lama e solo provenientes de áreas afetadas pelo acidente ocorrido em Aznalcóllar, (ALZAGA *et al.*, 1999). Durante o período de retirada do rejeito tóxico de Aznalcóllar para recuperação do ambiente, também foram identificadas aminas aromáticas em material particulado atmosférico (QUEROL *et al.*, 1999).

Ainda com relação as aminas, sabe-se que são descartadas para as barragens de rejeitos após o processo de flotação. Os mecanismos de degradação destes compostos não são muito conhecidos, nem quais os subprodutos são formados, podendo serem até mais tóxicos do que os compostos de origem.

Além do uso de aminas, a combinação de diaminas com coletores extensores de cadeia (reagentes apolares – óleos combustíveis), tem sido também aplicada para a concentração de minério de ferro por flotação. Os principais extensores de cadeia utilizados são ácidos e álcoois graxos que ligados aos agrupamentos amina aumentam a capacidade de flotação (NEDER e FILHO, 2005).

Em 2004, Pereira já citava o uso da combinação de eterdiaminas com querosene na flotação de minérios itabiríticos (PEREIRA, 2004). Pereira (2004) ainda cita que o uso de óleos combustíveis no processo de flotação em áreas de mineração é uma prática usual. Descreve o uso destes aditivos em áreas de mineração, à época controladas pela antiga Samitri, e que hoje são operadas pela SAMARCO, é uma prática usual:

“Como já é sabido da utilização de óleos combustíveis na flotação catiônica reversa do minério de ferro (Samitri em Alegria, hoje CVRD, e CSN em Casa de Pedra), esse trabalho pretende apenas lançar as bases tecnológicas fundamentais para sustentar essa utilização, bem como melhorar as mesmas pela introdução de inovações nos reagentes empregados, utilizando emulsificantes, e métodos de preparação das emulsões.” pp.189

Durante a flotação, maior parte das aminas fica contida na polpa do rejeito, juntamente com a sílica, e posteriormente é descartada para as barragens de rejeito, podendo, portanto, serem potenciais fontes de contaminação para o meio ambiente.

Além do uso de aminas durante o processo de flotação, devemos salientar a grande quantidade de compostos e misturas utilizados como espumantes. Dentre os mais comuns utilizados na indústria de mineração de ferro estão cresóis (metil fenóis), óleos de pinho (mistura de hidrocarbonetos e álcoois terpênicos, sendo o principal componente o α -terpineol), álcoois sulfatados, entre outros (SILVA, 2008).

Todos os reagentes orgânicos utilizados na concentração de óxidos de ferro são nocivos ao ambiente aquático, uma vez que reduzem a absorção de oxigênio, diminuindo a autodepuração dos rios (ARAÚJO, 2007). Diante da preocupação com as condições ambientais atuais do Rio Doce após o acidente com a lama, uma avaliação/monitoramento minucioso quanto a presença destes compostos, em especial as aminas, deve ser realizado devido às alterações que estes podem causar a biota local.

Dessa forma, observamos a necessidade de monitoramento de várias classes de compostos orgânicos. Isto tudo devido a grande quantidade de compostos aqui relacionados que são amplamente utilizados pela indústria de mineração de ferro em suas atividades. Tal avaliação/monitoramento também se justifica devido a inexistência de informações a respeito dos processos utilizados pela SAMARCO, assim como da composição dos rejeitos de sua produção.

A fim de verificar a presença e a correlação direta ou não com o rejeito, dentro deste contexto, ressaltamos a necessidade de análises para a determinação de hidrocarbonetos, HPA, aminas e ácidos graxos.

Salientamos ainda, que a determinação destes compostos nas amostras de água e sedimento auxiliarão no acompanhamento dos processos mitigatórios de recuperação do Rio Doce e conseqüentemente na avaliação da eficiência dos processos utilizados, uma vez que poderemos inferir por meio destas análises a qualidade do material orgânico fluvial transportado para o ambiente costeiro.

Em relatórios já apresentados, destacamos as altas concentrações de hidrocarbonetos e HPA encontrados logo após a passagem da lama perto da desembocadura do Rio Doce. Nestes estudos verificamos que estes compostos apresentaram tendência de aumento tanto sazonal quanto espacial similar aos demais parâmetros estudados correlacionados com a lama de rejeitos. Estes compostos podem ser analisados como possíveis traçadores da lama, caso detectados nas amostras.

Fenóis

A determinação de fenóis nas amostras de água é justificada como citada anteriormente devido ao uso de cresóis como agentes espumantes. Fenóis apresentam alta toxicidade em água e portanto, devem ser contemplados nas análises de água, conforme se orienta a regulamentação do CONAMA.

Pesticidas, PCBs e contaminantes emergentes

Acreditamos que a orientação para determinar a concentração de pesticidas, PCBs e contaminantes emergentes se fez presente no TR, para que se pudesse avaliar todo e qualquer efeito do desastre, não causado apenas pela toxicidade da lama, mas sim devido ao seu efeito de carrear compostos e produtos da calha do rio para a região estuarina e marinha. A lama extravasou o leito do rio causando a destruição de edificações e estruturas de uso público e privado, como estações de esgoto pluvial e sanitário carreando diversos contaminantes que podem ser tanto de origem de efluentes domésticos quanto industriais. Também grandes áreas de agricultura e pecuária foram varridas com a lama, carreando provavelmente, uma grande quantidade de pesticidas para os corpos hídricos e estes alcançando o oceano. Insta mencionar que os PCBs e Pesticidas constam na Resolução CONAMA 357/05.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Rodríguez, R.; Páez-Osuna, F.; Cortés-Altamirano, R. Trophic Conditions and Stoichiometric Nutrient Balance in Subtropical Waters Influenced by Municipal Sewage Effluents in Mazatlán Bay (SE Gulf of California). **Marine Pollution Bulletin**, vol. 4, pág. 331-339, 2000.

- Alzaga, R *et al.* Characterization of organic compounds in soil and water affected by pyrite tailing spillage. **Science of The Total Environment**, v. 242, n. 1–3, p. 167–178, dez. 1999.
- Araujo, A. C.; Viana, P. R. M.; Peres, A. E. C. Reagents in iron ores flotation. **Minerals Engineering**, vol. 18, pág. 219-224, 2005.
- Araújo, D. M. Reciclagem de Resíduos da Flotação de Minério de Ferro: Caracterização e Estudos da Biodegradação das Aminas nas Barragens de Rejeito. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências-Química). Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- Batisteli, A. E. C. P. *Amina residual na flotação catiônica reversa de minério de ferro*. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- Bulatovic, S. M. (2007). *Handbook of Flotation Reagents*. Elsevier Science & Technology Books, v. 1, 448p
- Coringa, J. E. S., PEZZA, L., CORINGA, E. A. O., WEBER, O. L. S. Distribuição geoquímica e biodisponibilidade de metais traço em sedimentos no Rio Bento Gomes, Poconé - MT, Brasil. **Acta Amazonica**, VOL. 46(2): 161 – 174. 2016
- Eça, G. F.; Lopes, J. B. B. S.; Souza, M. F. L.; Belém, A. L. Dissolved inorganic nutrients and chlorophyll on the narrow continental shelf of eastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, vol. 62 (1), pág. 11-21, 2014.
- Greer, R. F.; SHANON, M. Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water **Pediatrics**, vol. 116, n.3, pág. 784, 2005.
- Gregg, W. W.; Ginoux, P.; Schopf, P. S.; Casey, N. W. Phytoplankton and iron: validation of a global three-dimensional ocean biogeochemical model. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, vol. 50, pág. 3143-3169.
- Hecky, R. E.; Kilham, P. Nutrients limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. **Limnology and Oceanography**, vol. 33(4), pág.796-822, 1988.
- Hutchins, D. A.; Bruland, K. W. Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime. **Nature**, vol. 393, pág. 561-564, 1998.
- Joossens, J. V.; Hill, M. J.; Elliott, P.; Stamler, R.; Lesaffre, E.; Dyer, A.; Nichols, R.; Kesteloot, H. Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries: European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. **International Journal of Epidemiology**, vol. 25, pág. 494–504, 1996.
- Martin, J. H.; Gordon, R. M.; Fitzwater, S.; Broenkow, W. W. Vertex: Phytoplankton/iron studies in the Gulf of Alaska. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, vol. 36(5), pág. 649-680, 1989.
- Monte, M. B. M.; Peres A. E. C. (2004). *Química de superfície na flotação*. Tratamento de Minérios, CETEM, p.339 – 407, Rio de Janeiro.
- Moore, C. M.; Mills, M. M.; Arrigo, K. R.; Berman-Frank, I.; Bopp, L.; Boyd, P. W.; Galbraith, E. D.; Geider, R. J.; Guieu, C.; Jaccard, S. L.; Jickells, T. D.; Roche, L. La.; Lenton, T. M.; Mahowald, N. M.; Marañón, E.;
- Marinov, I.; Moore, J. K.; Nakatsuka, T.; Oschlies, A.; Saito, M. A.; Thingstad, T. F.; Tsuda, A.; Ulloa, O. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. **Nature geoscience**, vol. 6, pág. 701-710, 2013.
- Neder, E. E., Salles, L. O uso de aminas graxas e seus derivados na flotação de minérios brasileiros. **Trabalho apresentado no XXI ENTMME**, Natal-RN, novembro, 2005.

- Oliveira, L. A. R.; Rosière, C. A.; Rios, F. J.; Andrade, S.; Moraes, R. Chemical fingerprint of iron oxides related to iron enrichment of banded iron formation from the Cauê Formation - Esperança Deposit, Quadrilátero Ferrífero, Brazil: a laser ablation ICP-MS study. **Brazilian Journal of Geology**, 45(2): 193-216, June 2015.
- Paye, H, S. Teor e distribuição de elementos terras raras e comparação de métodos de extração de elementos traço em solos brasileiros. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Viçosa. 84p. 2014.
- Pereira, A. A., Hattum, B., Brouwer, A., Bodegom, P. M., Rezende, C. E., Salomons, W. Effects of iron-ore mining and processing on metal bioavailability in a tropical coastal lagoon. **Journal Soils Sediments**, 8:239–252. 2008
- Pereira, S. R. N. *O uso de óleos apolares na flotação catiônica reversa de um minério de ferro*. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Universidade Federal De Minas Gerais, 2004
- Peres, A. E. C; Salum, M. J. G.; Valadão, G. E. S. Araújo, A. C. (2007). *Métodos de Concentração In. Introdução ao Tratamento de Minérios*. Editora UFMG, p. 105-139, Belo Horizonte.
- Querol, Xavier *et al.* Physico-chemical characterisation of atmospheric aerosols in a rural area affected by the aznalcollar toxic spill, south-west Spain during the soil reclamation activities. **Science of the Total Environment**, v. 242, n. 1–3, p. 89–104, 1999.
- Rosa, T. D. L. Avaliação da relação entre indicadores microbiológicos de toxicidade e a biodisponibilidade de metais em um ecossistema costeiro (Baía de Sepetiba – RJ). **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal Fluminense. 107p. 2011.
- Schmit, V. H.; Tilman, G. D.; Nekola, J. C. Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwaters, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, vol. 100, pág. 179-196, 1999.
- Silva, R. R. R. *Interação e entre Surfactantes na Flotação de Minérios de Ferro*. **Tese** (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- Tsukigane, S.; Sasazuki, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer**, vol. 10, pág. 75-83, 2007.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO (UFES). Monitoramento da Influência da Pluma do Rio Doce após o rompimento da Barragem de Rejeitos em Mariana/MG - Novembro de 2015: Processamento, Interpretação e Consolidação de Dados. **Relatório Técnico**. Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Oceanografia. 254p. 2017.
- Wills, B.A.; Munn, N. M. (2006). *Mineral Processing Technology*. Elsevier Science & Technology Books, Edition 7, **267-352p**.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: SEDIMENTOLOGIA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Valéria da Silva Quaresma	Coordenação	UFES
Marcos Tadeu Orlando	Pesquisador	UFES
Caio Turbay	Pesquisador	UFES
Pós Doutor	Pesquisador	UFES
Pós Doutor	Pesquisador	UFES
Pós Doutor	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Superior	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Superior	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Superior	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Superior	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Superior	Pesquisador	UFES
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

O escopo deste projeto é monitorar o padrão de dispersão do material particulado em suspensão (MPS) bem como acompanhar a evolução do depósito sedimentar oriundo do Rio Doce na plataforma adjacente. A caracterização do material de rejeito, seja do ponto de vista sedimentológico ou mineralógico, bem como as variações na concentração do MPS irão integrar a base de conhecimento para o melhor entendimento do padrão de dispersão da pluma do Rio Doce, seu alcance e extensão ao longo da zona costeira e plataforma continental adjacente.

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.

Objetivos específicos:

1. Amostrar, caracterizar e quantificar o MPS em estações pré-definidas;
2. Investigar e determinar o padrão de aporte, dispersão e sedimentação do MPS sob influência de diferentes forçantes meteoceanográficas e fluvial;
3. Caracterização do sedimento de fundo do ponto de vista granulométrico, composicional e mineralógico (cristalografia e mineralogia das argilas);
4. Identificar áreas preferenciais de acúmulo do rejeito;

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Análise mensal de MPS e sedimento de fundo

Processamento e análise de dados mensais coletados em 11 estações (pré-definidas no TR); determinação de concentração de MPS; determinação de granulometria, densidade, teor de CaCO_3 e MO dos sedimentos de fundo; e elaboração da planilha de dados e alimentação de banco dos dados.

Meta 2- Análise trimestral de MPS e sedimento de fundo

Processamento e análise de dados trimestrais coletados em 34 estações (pré-definidas no TR); determinação de concentração de MPS; determinação de granulometria, mineralogia de argila (em

amostras pré-selecionadas), densidade, teor de CaCO_3 e MO dos sedimentos de fundo; e elaboração da planilha de dados e alimentação de banco dos dados.

Meta 3- Análise semestral de MPS e sedimento de fundo

Processamento e análise de dados semestrais coletados em 41 estações (pré-definidas no TR); determinação de concentração de MPS; determinação de granulometria, densidade, teor de CaCO_3 e MO dos sedimentos de fundo; e elaboração da planilha de dados e alimentação de banco dos dados.

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>
Granulometria Teor de Carbonato Teor de Matéria Orgânica Concentração de Material Particulado em Suspensão Mineralogia de amostras de fundo	Profa. Valéria Quaresma Prof. Marcos Tadeu Orlando

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise espaço-temporal da variação do sedimento depositado (quanto a granulometria e composição) e do material em suspensão (quanto a concentração) na foz do Rio Doce e regiões adjacentes (mensal/trimestral e semestralmente). Discussão da variabilidade do processo sedimentar considerando a integração dos dados sedimentares com os dados de fundeio. - Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes.	Profa. Valéria Quaresma Prof. Caio Turbay Prof. Marcos Tadeu Orlando

6. METODOLOGIA

PROCEDIMENTOS DE COLETA

Coleta de água para determinação de concentração de mps:

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), meio (metade da profundidade – variável nas estações) e fundo (cerca de 50cm acima do fundo).

Deverá ser coletado 2L de água e armazenadas em frascos. Esses frascos devem ser refrigerados logo após a coleta. Caso haja possibilidades e logística as amostras poderão ser filtradas a bordo, durante a execução do trabalho de campo. Na embarcação, uma sub-amostra deverá ser imediatamente submetida a medição de turbidez.

Coleta de sedimento

A coleta de sedimento de fundo deverá ser realizada com *box corer* ou busca fundo *Van Veen* desde que se possa sub-amostrar estratigraficamente os estratos.

Uma vez aberta, a amostra deverá ser fotografada e identificada pelo número da estação e datada com marcação da hora de coleta. A análise de ocorrência da lama alaranjada na superfície da amostra deverá ser anotada e, se possível, determinar com uma régua a espessura desta lama de menor densidade. Deverão ser coletadas subamostras seguindo a seguinte metodologia:

Densidade - amostrar os centímetros superficiais (primeiros 2cm) usando um *ependorf* ou tubo de 5ml, de peso conhecido, e seguindo o reconhecimento da lama alaranjada. O volume total coletado deve ser conhecido.

Granulometria total e mineral de argila - amostrar sedimento superficial (primeiros 5cm) obtendo cerca de 200 gramas de amostra.

PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES

Análise de concentração MPS

Para determinação da concentração do Material Particulado em Suspensão será utilizado o método gravimétrico com filtragem da água em filtro de fibra de vidro com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. Os filtros devem ser pesados previamente e secos em estufa a 40°C. Depois do processo de filtração, o mesmo deve ser novamente seco em estufa em 40°C. Após esse procedimento os filtros deverão ser colocados em um dessecador para evitar absorção de umidade, e serem, pesados e identificados individualmente.

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

Análise Granulométrica

Cerca de 60g de sedimento deverá ser lavado em água doce para retirada de sal e colocado para secar em estufa a 40°C pelo tempo que for necessário para completa retirada de água. Após o sedimento seco, o mesmo deverá ser pesado e peneirado via úmida em peneira de 63 micrômetros para separação da fração areia. Novamente o procedimento de secagem da fração areia deverá ser repetido, e uma nova pesagem (desta fração) será realizada para determinação dos teores de lama e areia.

A granulometria da fração areia deverá ser determinada por peneiramento de 0,5 em 0,5 Fi e a fração lama deverá ser levada ao granulômetro a laser após queima de MO por peróxido. No caso da fração lama não há necessidade de novo procedimento de secagem, uma vez que, o granulômetro utiliza amostras úmidas. Os valores dos teores deverão ser determinados a partir da diferença entre o peso total e o peso da fração areia, assim se chegando ao peso da fração lama, Sabendo-se o peso da fração lama o resultado da análise no granulômetro deverá ser normalizada para o peso correspondente.

Análise Composicional de CaCO₃ e Matéria Orgânica(MO)

As amostras de sedimento de fundo serão submetidas a queima de carbonato com ácido clorídrico diluído a 30%. O teor de CaCO₃ será definido pela diferença do peso antes e após a queima do carbonato. A MO contida no sedimento será determinada pela queima em mufla à 550° C por 4 horas. O teor de MO será determinado pela diferença entre o peso pré queima e pós queima.

Análise da Densidade do depósito

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

Mineralogia da fração lamosa

A determinação mineralógica na fração lamosa será realizada pelo método da difratometria de raios-x, utilizando-se a metodologia convencional, com radiação Cu-K alfa (comprimento médio $\langle \lambda \rangle = 0.15419$ nm) e geometria Theta/2Theta Bragg-Bretano. A amplitude angular utilizada varia de 3.00° a 90.00°, com intervalos de 0.04°, utilizando Cu-K alfa duplo, com comprimento de onda 0,154056 (65%) e 0,154439 (35%). Um monocromador LiF será incorporado no detector de radiação. Para a determinação das características do equipamento e leitura do branco, uma amostra padrão NIST Si será mensurada antes das medições das amostras.

Os resultados nas análises de difratometria de raios-x são transmitidos através de valores angulares (2 Theta) e intensidade de sinal. Com base nestes valores são montados em planilhas eletrônicas os gráficos que representam os difratogramas. Os difratogramas registram nos eixos das abscissas o ângulo

2Theta. O ângulo entre um feixe de raios-x que difratam na superfície de um plano cristalino e a normal ao plano é Theta. Com base na geometria e conhecendo-se a equação de Bragg, é possível medir as distâncias (d) entre planos dentro de um cristal e com isso, determinar a possível espécie mineral cristalina. No eixo das ordenadas são dispostos os valores relativos à intensidade do sinal analítico (energia absorvida por um determinado plano cristalino). Com base nesse parâmetro, é possível medir indiretamente os tamanhos dos cristais e seus graus de perfeição cristalina (cristalinidade).

O procedimento analítico interpretativo terá como base principalmente fichas e bases minerais existentes na literatura e WEB, onde são listados parâmetros relativos aos distanciamentos dentro dos retículos cristalinos (d), além das relações angulares e axiais em diferentes espécies minerais.

A fluorescência de raios-x complementar as informações da difração, fornecendo os principais constituintes químicos presentes em porcentagem em peso e partes por milhão (ppm), nas amostras analisadas.

Para as análises químicas na fluorescência, cerca de 8 a 10 gramas de cada amostras de lama serão misturadas a 16 gramas de material orgânico ligante. O conjunto é então homogenizado em almoriz e levado dentro de cápsula de aço com diâmetro interno de 35 mm para uma prensa hidráulica, sendo produzida então a pastilha prensada, que será analisada pela fluorescência de raios-x.

As análises serão realizado em equipamento com cristal analisador padrão de fluoreto de lítio LIF 200. Antes da realização das leituras, as medidas do equipamento e o erro analítico serão mensurados através de amostra de padrão analítico internacional.

As fases minerais encontradas serão por fim imageadas em microscópio eletrônico de varredura e analisados quimicamente de forma qualitativa por EDS acoplado.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: BENTOS – Sedimento Inconsolidado

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dra. Leila de Lourdes Longo	Coordenação	UFRB
Dra. Mercia Barcellos da Costa	Pesquisador	UFES
Dra. Adriane Araújo Braga	Pesquisador	UFES
Técnico nível superior	Pesquisador	UFES
Técnico nível superior	Pesquisador	UFRB
Pós Doutorado	Pesquisador	UFES
Pós Doutorado	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFRB
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	UFRB
Profissional Mestre I	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFRB
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

As comunidades bentônicas desempenham um papel importante no fluxo de energia nas teias tróficas em ambientes marinhos e estuarinos. Além de sua importância dentro das cadeias alimentares, muitas espécies pertencentes à macrofauna benthica podem ser utilizadas como indicadores de condições ambientais devido a suas respostas às alterações ambientais, principalmente por se tratarem de organismos sedentários ou com baixa mobilidade. Devido à sua sensibilidade, algumas comunidades bentônicas podem ser afetadas drasticamente, podendo sofrer redução na composição e abundância de espécies, muitas vezes havendo desaparecimento de populações.

3. OBJETIVO

Caracterizar a estrutura das comunidades bentônicas em áreas sob influência dos impactos oriundos do rompimento da barragem do Fundão (Mariana-MG), por meio de padrões de riqueza, diversidade e abundância de espécies nesses locais e correlacionar as variáveis biológicas, sedimentológicas e químicas à ocorrência dos táxons que compõem a fauna do substrato inconsolidado.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Mapeamento dos ambientes bentônicos por meio do conhecimento da diversidade biológica associada aos substratos inconsolidados. Avaliação trimestral.

- A - Coleta de sedimento superficial;
- B- Lavagem em peneiras de 1 e 0,5 mm;
- C – Separação da Macrofauna;
- D -Triagem dos organismos;
- E- Identificação dos organismos;
- F – Confecção de planilhas com resultados;
- G – Cálculos dos Índices Ecológicos;
- H- Confecção de relatórios trimestrais.

Meta 2- Mapeamento dos ambientes bentônicos por meio do conhecimento da diversidade biológica associada aos substratos inconsolidados. Avaliação semestral.

- A - Coleta de sedimento superficial;
- B- Lavagem em peneiras de 1 e 0,5 mm;

- C – Separação da Macrofauna;
- D -Triagem dos organismos;
- E- Identificação dos organismos;
- F – Confecção de planilhas com resultados;
- G – Cálculos dos Índices Ecológicos;
- H- Confecção de relatórios semestrais.

Meta 3- Mapeamento dos ambientes bentônicos por meio do conhecimento da diversidade biológica associada aos substratos inconsolidados. Integração dos dados.

Análises multivariadas evidenciando possíveis interferências dos dados abióticos na distribuição geográfica das espécies e produção de mapas de habitats com componentes bióticos e abióticos.

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>
<ul style="list-style-type: none"> - Lista taxonômica e quantificação dos organismos por unidade amostral; - Planilhas com valores dos índices que descrevem a estrutura de comunidades nas unidades amostrais; - Planilhas com dados de granulometria e ocorrência dos táxons para avaliação da interferência dos dados abióticos na distribuição dos organismos. 	Dra.Leila de Lourdes Longo, Dra. Mércia Barcellos da Costa, Dra. Adriane Araújo Braga
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Estudos taxonômicos dos organismos com produção de lista de espécies; - Análises de Índices Ecológicos e Descritores de Comunidades, caracterizando a estrutura das comunidades nas unidades amostrais; - Análises multivariadas evidenciando possíveis interferências dos dados abióticos (granulometria) na distribuição geográfica das espécies, gerando um mapa de habitats com componentes bióticos e abióticos. - Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes. 	Dra. Leila de Lourdes Longo, Dra. Mércia Barcellos da Costa, Dra. Adriane Araújo Braga

6. METODOLOGIA

A coleta das amostras deverá ser realizada em substrato inconsolidado por meio do lançamento de amostrador tradicional (van Veen), com volume mínimo de 3 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 registros, onde serão anotadas 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.

No momento da chegada do amostrador a bordo, as amostras deverão ser fotografadas, transferidas para sacolas duplas etiquetadas, fixadas em álcool 70% e fechadas de forma a impedir a perda do líquido conservante. Em laboratório, cada amostra deverá ser subdividida em três partes iguais. Estas amostras deverão ser lavadas em peneiras de 1mm e 0,5mm, separadas amostras de 1mm e de 0,5mm de malha devidamente etiquetadas. De cada amostra destinadas à análise da fauna será retirada uma alíquota de 100ml (3 amostras/malha/ponto) para posterior triagem e identificação dos organismos. O material restante será conservado para estudos posteriores.

No momento da triagem, sob microscópio estereoscópico, os organismos serão separados em grandes grupos, a saber, Moluscos, Crustáceos, Poliquetas e Outros. Os moluscos serão identificados pelo Laboratório de Malacologia (Responsável: Dra. Mercia B. Costa). Os Crustáceos serão identificados pelo

Laboratório de Zoologia (Responsável: Dra Adriane A. Braga). Os Poliquetas serão identificados pela Dra. Mariana Beatriz Paz Otegui (Pesquisadora-associada no Laboratório de Malacologia). Os organismos pertencentes aos outros grupos serão enviados para o Laboratório de Organismos Marinhos Bentônicos (Responsável: Dra. Leila de L. Longo). As análises do material triado deverão considerar o menor nível taxonômico possível. Os organismos para os quais não for possível a identificação, serão encaminhados a outros de especialistas.

A partir dos dados obtidos serão determinados: - a riqueza S da comunidade, diversidade de Shannon-Wiener, e a Dominância de Simpson; - o grau de similaridade entre os pontos amostrais, por meio de análises de classificação e ordenação, utilizando-se descritores complexos de comunidade, de forma que os componentes bióticos estudados em diferentes ambientes geomorfológicos e profundidades da plataforma continental, ao longo do período de amostragem, serão comparados para identificação de suas possíveis peculiaridades.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: FITOPLÂNCTON MARINHO

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Prof. Dr. Camilo Dias Junior	Coordenador Geral do sub-projeto	DOC/UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	DOC/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	DOC/UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	DOC/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES

2. ESCOPO

O presente projeto visa acompanhar os efeitos do rejeito de minério sobre a comunidade fitoplanctônica, já que esta é a principal responsável pela produtividade marinha. Estes estudos permitirão: verificar se ocorreram mudanças quantitativas e na composição quali-quantitativas do fitoplâncton na área atingida; verificar quais os efeitos do impacto sobre a biomassa fitoplanctônica produtora de oxigênio e base das cadeias alimentares pelágicas; acompanhar o processo de recuperação da comunidade fitoplanctônica a curto e médio prazo; avaliar a existência de variações espaciais do efeito do impacto sobre a comunidade fitoplanctônica; avaliar o grau de senescência do fitoplâncton através da quantificação da clorofila *a* e feopigmento; determinar as relações das variações da comunidade fitoplanctônica com as variações químicas, físicas e físico-químicas causadas pelo impacto, através das relações causa-efeito e registrar a ocorrência de modificações morfo-fisiológicas das algas fitoplanctônicas causadas pela exposição ao rejeito.

3. OBJETIVO

Avaliar e descrever o quadro geral de efeitos espaciais e temporais do rejeito de minério sobre as comunidades fitoplanctônica marinhas da bacia do Espírito Santo e região estuarina do Rio Doce a curto e médio prazo.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1-Análise quantitativa do fitoplâncton

Análise quantitativa do fitoplâncton nas áreas marinhas e estuarinas impactadas pelo rejeito e a extensão espacial e temporal deste impacto

Meta 2- Análise qualitativa do fitoplâncton

Análise qualitativa do fitoplâncton nas áreas marinhas e estuarinas afetadas para aferimento dos efeitos do impacto sobre a diversidade biológica do fitoplâncton.

Meta 3- Determinação das alterações na biomassa fitoplanctônica

Determinação das alterações na biomassa fitoplanctônica através da quantificação da clorofila *a* na área atingida. Contemplado no item Clorofila *a* e Feopigmentosno, no tópico **3.2 Parâmetros físico-químicos da água** do Termo de Referência.

Meta 4- Análise do estado fisiológico do fitoplâncton

Análise do estado fisiológico do fitoplâncton através da quantificação comparativa da clorofila *a* e dos feopigmentos. Contemplado no item Clorofila *a* e Feopigmentosno, no tópico **3.2 Parâmetros físico-químicos da água** do Termo de Referência.

Meta 5- Análise dos efeitos específicos

Análise dos efeitos específicos dos componentes químicos do rejeito sobre o fitoplâncton e das variáveis físicas e químico-físicas causadas pela exposição do fitoplâncton ao rejeito, através da quantificação contemplada no item Fitoplâncton, no tópico **3.5.6 Análise do Plâncton** do Termo de Referência e comparação com as análises contempladas no tópico **3.2 Parâmetros físico-químicos da água** do Termo de Referência.

Meta 6- Identificação de modificações morfo-fisiológicas

Identificação de modificações morfo-fisiológicas sobre as espécies fitoplancônicas causadas pela exposição ao rejeito. Contemplado no item Fitoplâncton, no tópico **3.5.6 Análise do Plâncton** do Termo de Referência.

Meta 7- Elaboração de listas de espécies

Elaboração de listas de espécies dos vários setores da área atingida e comparar as modificações na composição qualitativa do fitoplâncton segundo o grau de impacto sofrido nestes setores.

JUSTIFICATIVAS

Em ambientes marinhos, o fitoplâncton é o principal produtor primário. Águas da plataforma continental sustentam cerca de 30% da produtividade oceânica total, embora esse valor seja extremamente variável.

Com o rompimento, em 5 de Novembro de 2015, da barragem de rejeitos de minério de ferro na localidade de Mariana (MG), foram despejados cerca de $16 \times 10^6 \text{m}^3$ no sistema fluvial e deslocado este volume de contaminantes ao longo de quase 700 km até à foz do Rio Doce na localidade de Regência (ES) e plataforma continental adjacente. Em 7 de Dezembro, a mancha de material em suspensão se espalhou ao longo da costa em quase 80 km, sendo que 57 km para o norte e 17,5 km para o sul, além de 18 km mar afora, conforme dados do IBAMA publicado no G1 na edição de Dezembro de 2015.

A comunidade fitoplanctônica, além de ser a base das cadeias alimentares pelágicas e grande produtor de oxigênio para a água e a atmosfera, é extremamente sensível a variações e impactos ambientais, sendo que necessariamente devem ser verificados os efeitos destes impactos sobre ela nos ambientes aquáticos. Além dos efeitos diretos de substâncias químicas sobre as algas fitoplanctônicas, esta comunidade é formada principalmente por organismos fotoautotróficos que dependem completamente da penetração de luz solar na coluna d'água e, portanto, foram muito atingidos pela mancha de material em suspensão formada na região atingida pelo impacto, podendo inclusive ser comprometida a produção de oxigênio nesta área.

CUMPRIMENTO DAS METAS

As metas apresentadas serão cumpridas divididas em 3 (três) grupos:

Meta 1- Levantamentos mensais:

Serão realizadas amostragens mensais na superfície e fundo de 11 pontos situados no estuário e próximo ao estuário do Rio Doce para determinação da biomassa fitoplanctônica utilizando-se a medição quantitativa da clorofila *a* e feopigmentos

Meta 2- Levantamentos trimestrais:

Serão realizadas amostragens trimestrais na superfície e fundo de 34 pontos amostrais (Incluindo os 12 mensais) cobrindo também uma área mais ao norte e mais ao sul da região estuarina do Rio Doce, para determinação da biomassa fitoplanctônica utilizando-se a medição quantitativa da clorofila *a* e feopigmentos e análises quantitativa e qualitativa do fitoplâncton utilizando-se os métodos de microscopia

Meta 3- Levantamentos semestrais:

Serão realizadas amostragens semestrais na superfície e fundo de 41 pontos amostrais (Incluindo os 47 trimestrais) cobrindo uma área que vai desde o Parque Nacional Marinho de Abrolhos até o litoral de Guarapari, para determinação da biomassa fitoplanctônica utilizando-se a medição quantitativa da clorofila *a* e feopigmentos e análises quantitativa e qualitativa do fitoplâncton utilizando-se os métodos de microscopia.

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>
Análise qualitativa do fitoplâncton Análise quantitativa do fitoplâncton Determinação dos valores de clorofila a e feopigmentos Determinação da biomassa do fitoplâncton Determinação das variações do perfil de luz na coluna d'água	Prof. Dr. Camilo Dias Junior
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise espaço-temporal da composição qualitativa e quantitativa do fitoplâncton na foz do Rio Doce e regiões adjacentes (mensal/trimestral). Análise espaço-temporal da clorofila a e feopigmentos na foz do Rio Doce e regiões adjacentes (mensal/trimestral). Discussão das variabilidades quali-quantitativas do fitoplâncton, levando-se em consideração as modificações das variáveis ambientais, integradas com as variáveis químicas (composição química da água) e físicas (penetração de luz) Discussão das modificações ecofisiológicas (saúde fisiológica) do fitoplâncton causadas por modificações nas variáveis ambientais - Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes.	Prof. Dr. Camilo Dias Junior

6. METODOLOGIA

As amostras do fitoplâncton na área de estudo serão coletadas em na superfície e próximo do fundo conjuntamente com as amostragens para determinação das variáveis químicas, bem como os perfis de penetração de luz. Tais amostras serão submetidas a análises qualitativas, quantitativas e quantificação da concentração de clorofila-a e feopigmentos em laboratório.

As amostras para análise qualitativa serão coletadas através de arrastos verticais com o uso de rede de plâncton com malha de 60 µm de abertura, à baixa velocidade, na superfície dos pontos, sendo imediatamente fixadas com solução formalina a 2%. Por outro lado, as amostragens quantitativas serão feitas com o uso de garrafa oceanográfica e também fixadas com solução formalina a 2%.

Na análise qualitativa do material coletado será empregado o uso de microscópio biológico óptico, equipado com câmera USB para registros de imagens; e ocular de medição. Os organismos serão esquematizados e identificados, analisando-se as suas características morfológicas e morfométricas e utilizando-se bibliografia especializada. Os nomes científicos das espécies encontradas nas amostras serão consultados junto ao banco de dados internacional ALGAEBASE (<http://www.algaebase.org/>).

A contagem do fitoplâncton será realizada utilizando-se câmara de sedimentação de Uthermöhl (UTHERMÖHL, 1958) em microscópio invertido, após um tempo mínimo de 24 horas de sedimentação.

O procedimento de contagem escolhido será o dos campos aleatórios, descrito por Uehlinger (1964). As coordenadas dos campos serão geradas por programa de computador e os campos foram localizados na platina do microscópio. Para cada contagem será gerado um sistema de campos aleatórios diferente. O critério utilizado para determinação do número de campos a serem contados é o que procura alcançar 100 indivíduos da espécie mais abundante. De acordo com Lund, Kipling e Le Cren (1958), isto permite trabalhar com intervalos de confiança de $\pm 20\%$ da média, a um nível de significância de 95%, o que é considerado como suficiente para estudos dessa natureza.

Para cada amostra serão contadas duas réplicas, tendo como resultado final uma média entre as duas contagens. Os resultados serão expressos em indivíduos por mL (densidade de organismos), conforme Equação 1 demonstrada adiante:

$$N = n \times \frac{A}{a} \times \frac{1}{V} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: **N** = Número de organismos por mL
n = número de organismos contados
a = Área contada
A = Área total da câmara
V = Volume total sedimentado

Além disso, os organismos serão classificados em duas frações de tamanho durante as contagens: nanofitoplâncton (2-19 µm) e microfitoplâncton (20-200 µm).

Os índices de diversidade específica (bits•organismo⁻¹) serão calculados a partir dos valores de densidade numérica do fitoplâncton, conforme o método proposto por Shannon e Weaver (1949). O Índice Diversidade de Shannon-Weaver será calculado a partir de todos os organismos amostrados de forma aleatória de uma população grande (infinita). Tal índice dará uma medida do grau médio de incerteza em predizer 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 5 bits (unidade de medida de H, sem dimensões vinculadas) por indivíduo. Ademais, a diversidade em comunidades fitoplanctônicas, em bits por célula, está normalmente entre 1 e 2,5 em águas costeiras e entre 3,5 e 4,5 em águas oceânicas.

Ademais, será calculada a equitabilidade das espécies através da expressão de Pielou (1977; 1966), cujos valores se enquadram entre 0 e 1, sendo considerado alto ou equitativo os índices superiores a 0,50, o qual representa uma distribuição uniforme dos táxons na amostra analisada. Logo, quanto mais igualmente distribuído estiver o total de indivíduos nas n espécies, maiores serão a equitabilidade e a diversidade.

As análises de clorofila-a e feopigmentos serão feitas seguindo-se os métodos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* da APHA/AWWA/WEF (2005), enquanto que a determinação espectrofotométrica da concentração de pigmentos fotossintéticos será obtida através das duas equações monocromática de Lorenzen (1967). Além disso, a clorofila-a ativa (%) será estimada a partir da razão dos valores de clorofila-a pela concentração total de pigmentos (clorofila-a e feopigmentos).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA - American Public Health Association. AWWA - American Water Works Association. WEF – Water Environment Federation. 2005. Biological Examination (10000): 10200 Plankton. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF).
- dajoz, R. 1973. *Ecologia*. São Paulo: Vozes, 472p.
- Lorenzen, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, v. 12, p. 343-346.
- Lund, J. W. G., Kipling C.; Le Cren, E. D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, v. 11, p. 143-70.
- MARGALEF, R. 1976. Diversity. In: SOURNIA, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle. UNESCO.
- Pielou, E. C. *Mathematical ecology*. New York: J. 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.
- Shannon, C. E.; Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois Press.

- Uehlinger, V. 1964. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Arch. Sci.*, v. 17, n. 2, p. 121-123.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, v.9, p. 1-38, 1958.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: ZOOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Luiz Fernando Loureiro Fernandes	Coordenador	UFES
Sergio Luiz Costa Bonecker	Pesquisador	UFRJ
Doutor II	Pesquisador	FURG
Pós Doutor	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Membro de Equipe	UFES
Profissional Mestre II	Membro de Equipe	UFES
Profissional Pleno II	Membro de Equipe	UFES
Profissional Pleno II	Membro de Equipe	UFES
Profissional Júnior	Membro de Equipe	UFES
Profissional Júnior	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES

2. ESCOPO

Coletar e analisar a comunidade zooplanctônica da região sob influência da pluma do Rio Doce

3. OBJETIVO

Analisar quali-quantitativamente o zooplâncton na região de amostragem verificando as possíveis alterações na composição, biomassa, abundância e diversidade.

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 e análise das comunidades

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>
Biomassa Abundância Composição	Luiz Fernando Loureiro Fernandes

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise espaço-temporal da variação da comunidade zooplanctônica na foz do Rio Doce e regiões adjacentes (mensal/trimestral/semestral). Discussão da variação da estrutura da comunidade zooplanctônica e correlação com os parâmetros ambientais. Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes.	Luiz Fernando Loureiro Fernandes

6. METODOLOGIA

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 até metade da profundidade, e da metade da profundidade até a superfície para evitar perdas devido a migração dos organismos. Acima de 30 metros as coletas deverão ser feitas do fundo até 30 metros, e depois seguindo o padrão anterior. O ideal é que as coletas de zooplâncton sejam feitas no período noturno se possível.

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 1.000 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, 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.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: ICTIOPLÂNCTON

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Doutor II - Ana Cristina Teixeira Bonecker	Coordenadora	UFRJ
Pós-Doutorado - Márcia Salustiano de Castro	Taxonomia e análise estatística, confecção de relatório	UFRJ
Profissional Júnior - Mariana Muguet Julio	Auxílio na identificação	UFRJ
Profissional Júnior - Luciana Helena Teixeira Cavaggioni	Processamento dos dados e alimentação do banco de dados	UFRJ
Profissional Júnior - Marta Cristiane de Carvalho Quintas	Triagem de amostras e cálculos de densidade	UFRJ
Profissional Júnior	Pesquisador	UFRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFRJ

2. ESCOPO

O estudo do icteoplâncton no ambiente costeiro e estuarino é de grande importância na identificação e avaliação de recursos pesqueiros, pois fornecem informações sobre épocas de desova, estimativas dos fatores que influenciam o recrutamento, avaliações das modificações espaço-temporais de composição e abundância das populações de interesse econômico e identificação de novos recursos pesqueiros (Ré *et al.*, 2005).

O sucesso dos indivíduos nos primeiros estágios de vida é crucial para manter o equilíbrio natural do estoque de peixes adultos. A sobrevivência e a distribuição dos ovos e larvas de peixes são muito dependentes dos processos físicos e biológicos, como condições hidrológicas locais associadas a processos de transporte, variação sazonal, densidades de predador e presa e os padrões de reprodução dos peixes adultos (Moser & Smith, 1993; Ramos *et al.*, 2006). Em geral fatores ambientais podem regular a abundância de ovos e larvas de duas maneiras: afetando o estoque ou a época de reprodução de peixes adultos diretamente ou influenciando a sobrevivência, o crescimento ou o desenvolvimento dos estágios juvenis (Baldó *et al.*, 2006).

3. OBJETIVO

Objetivo geral do projeto

- Monitorar quali-quantitativamente a comunidade icteoplânctônica sob a influência da pluma de sedimentos a partir da foz do rio Doce e região costeira adjacente.

Objetivos específicos

- Analisar a densidade icteoplânctônica,
- Identificar os ovos e larvas de peixe na região,
- Verificar a variação anual da comunidade icteoplânctônica,
- Descrever a distribuição espacial das assembleias de larvas de peixes,
- Verificar locais de desova durante o período de estudo.
- Avaliar se os sedimentos advindos do rompimento da barragem e aportados no Rio Doce estão influenciando a comunidade icteoplânctônica.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Triagem do material

Após o recebimento das amostras no laboratório será iniciado o processo de triagem das mesmas. Inicialmente serão triadas as amostras da rede neustônica (superior e inferior) e em seguida da rede bongô (malhas de 330 e 500 µm).

Meta 2- Identificação e Análise dos dados

Em seguida os ovos e larvas de peixes serão identificados com base nos caracteres merísticos e morfométricos até o menor nível taxonômico possível e anotado os estádios de desenvolvimento. Serão realizados cálculos de volume de água filtrada, densidade, riqueza, além de testes estatísticos para responder os objetivos propostos.

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>
Número bruto e densidade de ovos e larvas de peixes Táxons identificados durante o estudo Estádios de desenvolvimento larvar Confeção de tabelas e gráficos Fotos das larvas de peixes para comparação com exemplares em coleções	Marta Ana, Márcia e Mariana Márcia e Mariana Luciana Mariana

6.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise espaço-temporal da variação dos ovos e larvas de peixes na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (trimestral e semestral). Comparar os resultados encontrados com os dados pretéritos na área da foz do Rio Doce e região costeira adjacente (trimestral e semestral). Avaliação de possíveis áreas de desova através da densidade de ovos e larvas nos primeiros estádios de desenvolvimento.	Ana, Márcia e Mariana Ana, Márcia e Luciana Ana, Márcia e Marta

6. METODOLOGIA

6.1 - Metodologia de coleta para os levantamentos trimestral e semestral

A - Rede de nêuston

A camada subsuperficial será amostrada trimestralmente e semestralmente utilizando a rede neustônica. 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 5 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.

B - Rede bongô

O ictioplâncton será coletado trimestralmente e semestralmente por arrastos oblíquos com rede bongô, desde próximo ao fundo até a superfície, segundo as recomendações de Smith & Richardson (1977). A rede bongô é formada por duas redes cônico-cilíndricas, com 60 cm de diâmetro e aberturas de malha de 330 e 500 μm). As redes serão equipadas com fluxômetros previamente aferidos. A velocidade de arrasto será de aproximadamente 2 nós, com duração média de 5 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}).

C - Análise em laboratório

Todas as análises serão realizadas no Laboratório de Ictioplâncton do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os ovos de peixes serão contados e triados, sob microscópio estereoscópico. As amostras com uma grande quantidade de ovos serão subamostradas com fracionador de Folsom (McEwen *et al.*, 1954). A contagem e triagem das larvas de peixes serão realizadas na totalidade da amostra.

Para a análise quantitativa será calculada a densidade dos ovos e larvas extrapolados para um volume padrão (100 m^{-3}).

A identificação dos ovos e larvas de peixes será realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, utilizando alguns parâmetros merísticos e morfométricos. As larvas serão medidas, para auxiliar na identificação, com ocular e lâmina milimetrada de 0,1 mm de precisão. Para medida do tamanho do corpo será utilizado o comprimento padrão (CP). A identificação será realizada com auxílio de referências bibliográficas 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 de famílias e espécies de peixes identificadas no presente estudo foram checados e atualizados seguindo Eschmeyer *et al.* (2017). Após a identificação todos os ovos e larvas serão tombados na coleção de ictioplâncton do Laboratório Integrado de Zooplâncton e Ictioplâncton da Universidade Federal do Rio de Janeiro – DZUFRJ.

D - Gráficos e tabelas

Para auxiliar na interpretação dos resultados serão confeccionados tabelas e gráficos, além da entrada dos dados no banco de dados Laboratório Integrado de Zooplâncton e Ictioplâncton da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Serão realizados testes estatísticos e análises multivariadas para auxiliar na interpretação dos resultados da assembleia das larvas de peixes.

E - Relatórios de resultados

Serão entregues laudos mensais com os valores brutos e as densidades de ovos e larvas de peixes registrados nas amostras coletadas com a rede neustônica e com a rede bongô (malhas de 330 e 500 μm). Após seis meses de amostragem será realizado um relatório consolidando os resultados obtidos até o momento.

Ao final dos 16 meses de estudo será entregue um relatório contendo os resultados referentes às quatro campanhas realizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonecker, A.C.T. & Castro, M.S. 2006. Atlas de larvas de peixes da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira. Museu Nacional Série Livros n. 19, Rio de Janeiro, 216 p.

- Baldó, F.; García-Isarch, E.; Jiménez, M.P.; Romero, Z.; Shánchez-Lamadrid, A. & Catalán, I.A. 2006. Spatial and temporal distribution of the early life stages of three commercial fish species in the northeastern shelf of the Gulf of Cádiz. *Deep-Sea Research II*, 53: 1391-1401.

- Bonecker, A.C.T.; Namiki, C.A.P.; Castro, M.S.; & Campos, P.N. 2014. *Catálogo dos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes da bacia de Campos*. [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Zoologia: guias e manuais de identificação series. Disponível em SciELO Books. 295 p.
- Eschmeyer, W.N.; Fricke, R.; Van Der Laan, R. (Eds). 2017. *Catalog of Fishes*. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso 05/01/2018.
- Fahay, M.P. 2007. *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.
- McEwen, G.F.; Johnson, M.W.; Folsom, T.R. 1954. A statistical analysis of the performance of the Folsom plankton sample splitter, based upon test observations. *Archives of Meteorology, Geophysics and Bioklimatology*, (Ser. A), N.7, P.502-527.
- Moser, H.G. & Smith, P.E. 1993. Larval assemblages and oceanic boundaries. *Bulletin of Marine Science*, 53(2): 283-289.
- Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. 2016. *Fishes of the world*. 5ª edição. John Wiley & Sons. New Jersey.
- Ramos, S.; Cowen, R.K.; Paris, C.; Ré, P.; Bordalo, A.A. 2006. Environmental forcing and larval fish assemblage dynamics in the Lima River estuary (NW Portugal). *Journal of Plankton Research*, 28: 275-286.
- Ré, P.; Azeiteiro, U. & Morgado, F. 2005. Ecologia do ictioplâncton. In: RÉ, P.; AZEITEIRO, U. & MORGADO, F. (Eds.). *Ecologia do plâncton marinho e estuarino*. Editora Afrontamento Porto, Portugal, p: 111-140.
- Richards, W.J. 2006. *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.
- Smith, P.E. & Richardson, S.L. 1977. Standard techniques for pelagic fish egg and larva survey. *FAO, Fish. Tech. Pap.*, 175: 1-100.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: FUNDOS RECIFAIS, RODOLITOS E MACROALGAS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Doutor II - Rodrigo Leão de Moura	Coordenador Temático Fundos Recifais	UFRJ/COPPE
Doutor II - Gilberto Amado Filho	Pesquisador	JBRJ
Doutor II - Paulo Salomon	Pesquisador	UFRJ
Pós-Doutorado - Fernando Moraes	Pesquisador	JBRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	JBRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	JBRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFRJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	UFRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	JBRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	JBRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	JBRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	JBRJ
Técnico Nível Médio	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	JBRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	UFRJ
Profissional Mestre	Pesquisador	UFRJ

2. ESCOPO

O rompimento da barragem de rejeitos de mineração de Fundão, conhecido como “Desastre de Mariana”, ocorreu em 5 de novembro de 2015 e configurou-se como o maior acidente ambiental já ocorrido no Brasil. Em 22 de novembro, a lama de rejeitos chegou ao mar, no Norte do Espírito Santo, afetando prontamente as praias de Regência e Povoação, tendo se alastrado subsequentemente por dezenas de quilômetros ao norte e ao sul da foz do Rio Doce, atingindo pesqueiros e recifes, bem como diversas unidades de conservação existentes e planejadas. As extensões e consequências do desastre sobre as comunidades marinhas ainda não são compreendidas, sendo imperativo que ecossistemas criticamente importantes e sensíveis, tais como os recifes, sejam mais bem caracterizados e monitorados, no sentido de se quantificar o dano e subsidiar medidas de mitigação e compensação.

O trabalho proposto consiste na caracterização e monitoramento dos recifes potencialmente impactados pelo desastre e áreas controle, em um gradiente de atenuação, abrangendo comunidades bentônicas e planctônicas de áreas recifais e bancos de rodolitos. Inserem-se também no contexto desta proposta avaliações específicas sobre as macroalgas. Os fundos recifais potencialmente impactados incluem os Recifes Esquecidos e a região de Itaúnas, e efeitos atenuados podem ser detectados nas estruturas recifais e bancos de rodolitos localizados na APA Costa das Algas e no RVS de Santa Cruz, bem como nas estruturas recifais e bancos de rodolitos no entorno do Arquipélago dos Abrolhos. As amostragens propostas, além de atenderem ao Termo de Referência, contemplam recifes e bancos de rodolitos submetidos a diferentes regimes oceanográficos (próximos e afastados da costa), em diferentes profundidades e, possivelmente, sob diferentes condições de saúde, tanto em decorrência da degradação crônica da região quanto em decorrência do desastre, permitindo elucidar os aspectos mais centrais acerca da estrutura e do funcionamento dinâmico dos ecossistemas recifais da costa capixaba e do Extremo Sul da Bahia.

A abordagem proposta visa atender ao Item 3.6 - Avaliação dos Habitats (anexo 3 do TR- 4 Programa de Biodiversidade Aquática), através da produção um quadro holístico sobre os sistemas recifais, bancos de rodolitos e fundos de algas da região abrangida pelo projeto, integrando dados do bentos e da coluna d'água [veja abordagens semelhantes em trabalhos já realizados pela equipe executora, publicados em periódicos científicos de alto nível (e.g. Bruce et al., 2012; Meirelles et al., 2015)]. Dessa forma integrada, será possível qualificar e quantificar os possíveis impactos do desastre, considerando a conectividade e a intensa dinâmica de metapopulações típica de ecossistemas marinhos costeiros.

Dentre os ecossistemas costeiros, os sistemas recifais compreendem um dos melhores indicadores (“canários de mina”) da saúde ambiental, visto que abrigam grande diversidade e espécies sensíveis a alterações ambientais, tais como os corais e as algas coralináceas. Lamentavelmente, os ecossistemas marinhos na área afetada pela lama do “Desastre de Mariana”, especialmente os recifes, não possuíam sequer uma caracterização prévia de sua diversidade, da estrutura das comunidades, e dos processos ecológicos chave, adicionando enorme complexidade à execução da proposta aqui apresentada.

3. OBJETIVO

O objetivo geral do projeto é caracterizar e monitorar os ambientes recifais e bancos de rodolitos potencialmente impactados pelo Desastre de Mariana, qualificando e quantificando seus efeitos no ecossistema recifal.

Especificamente, pretende-se:

- **3.1-** Caracterizar as comunidades bentônicas recifais, incluindo bancos de rodolitos, quanto à sua diversidade, estrutura de comunidades, dinâmica e processos ecológicos chave;
- **3.2-** Caracterizar as comunidades planctônicas auto e heterotróficas associadas aos recifes quanto à sua abundância, diversidade, estrutura de comunidades e dinâmica temporal;
- **3.3-** Monitorar as comunidades recifais bentônicas e planctônicas das áreas recifais e bancos de rodolitos, contemplando áreas potencialmente mais ou menos afetadas pelo desastre, por um período inicial de 12 meses;
- **3.4-** Avaliar o estado de saúde de corais em áreas sob distintas forçantes oceanográficas;

- **3.5-** Monitorar o estabelecimento de flora e flora e sua produção de CaCO_3 em substratos livres (placas artificiais do tipo CAU - Calcification Acreation Units) instaladas anualmente nas formações recifais e bancos de rodolitos.
- **3.6-** Caracterizar as macroalgas associadas a fundos recifais e bancos de rodolitos.
- **3.7-** Determinar taxas de sedimentação e composição do material sedimentar em áreas recifais e bancos de rodolitos sob distintas forçantes oceanográficas e diferentes níveis de impacto potencial relacionado ao desastre.

Secundariamente, o projeto também contemplará coletas de água e sedimentos para análises geoquímicas (metais, orgânicos e elementares), bem como coletas de material biológico (organismos recifais) para análises genéticas e ecotoxicológicas, disponibilizando esse material para estudos complementares.

4. METAS

4.1- Comunidades Recifais Bentônicas e Planctônicas. Amostragens quali e quantitativas em comunidades recifais bentônicas e comunidades planctônicas associadas às formações recifais. Caracterização da diversidade, estrutura e espécies/grupos chave das comunidades recifais bentônicas e planctônicas, ao término do primeiro ano de execução do projeto.

4.2- Monitoramento Abiótico em Fundos Recifais. Aquisição de variáveis ambientais (clorofila, O.D., pH, nutrientes, temperatura e salinidade, turbidez, complexidade do fundo) nas áreas recifais.

4.3- Dinâmica das Comunidades Recifais e Planctônicas associadas aos recifes. Estudo da variação sazonal das comunidades bentônicas e planctônicas em 12 meses.

4.4- Estudo da Saúde de Corais. Estado de saúde de corais avaliado com diferentes abordagens (e.g. fluorometria de pulso amplificado, densidade de zooxantelas, genotipagem de simbiontes) e em áreas sob distintas forçantes naturais e antropogênicas.

4.5- Taxas de Sedimentação em Fundos Recifais. Instalação de sistemas de amostragem (armadilhas de sedimento) para estudos sedimentológicos em áreas recifais, com a determinação de taxas de sedimentação e composição do material sedimentar. Análise em 12 meses.

4.6- Amostragem de Rodolitos e Macroalgas. Coleta e/ou imagem de fundos de rodolitos ao longo das estações definidas no Anexo 3 do TR4. Determinação da concentração, vitalidade, forma e taxonomia de rodolitos e macroalgas.

4.7- Unidas de Calcificação. Instalação de CAUs (unidades de calcificação) em fundos recifais e de rodolitos. Análise anual dos organismos (fauna e flora) incrustantes nas placas e produção de CaCO_3 .

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>
- Organização e tabulação dos dados das quantificações das proporções corais saudáveis/branqueados, identificação molecular e densidade de zooxantelas, fotossíntese dos coraiszooxantelas estimada através de fluorometria de pulso amplificado (PAM). - Tabulação dos dados das quantificações relativas a abundância dos organismos bentônicos nos fotoquadrados e comunidades	Rodrigo Moura

<p>planctônicas associadas. Retirada dos sensores de temperatura após 12 meses instalados nos locais de amostragem. Retirada das unidades de calcificação após 12 meses instaladas. Retirada e processamento das amostras de sedimento obtidas com as armadilhas.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Identificação das espécies encontradas e quantificação dos grupos/espécies chave dos fundos recifais (planilha) - Organização e tabulação dos dados das amostragens da comunidade bentônica de fundos recifais, realizadas trimestralmente 	
<ul style="list-style-type: none"> - Organização e tabulação dos dados sobre as quantificações realizadas com as amostras e imagens obtidas - Retirada dos CAUS após 12 meses de instalação. Tabulação dos dados, quantificação dos grupos/espécies e produção de CaCO₃ - Tabulação dos dados de composição de espécies de rodolitos e macroalgas 	Gilberto Amado Filho
<ul style="list-style-type: none"> - Tabela com taxas de acumulação e composição do sedimento acumulado (teor de carbonato) e a composição mineralógica para terrígenos. Análises geoquímicas na água. 	Alex Cardoso Bastos
<ul style="list-style-type: none"> - Citogramas e imagens referentes a comunidade planctônica - Organização e tabulação dos dados das amostragens da comunidade planctônica realizadas trimestralmente 	Paulo Salomon

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Interpretação preliminar sobre as quantificações dos organismos bentônicos e comunidades planctônicas. Análise e interpretação preliminar sobre os dados de temperatura obtidos com os sensores. Interpretação preliminar sobre as comunidades estabelecidas nas placas de colonização. Análise preliminar sobre a composição básica dos sedimentos. - Interpretação preliminar sobre as comunidades recifais encontradas nos sítios amostrados e suas forçantes ambientais. Os locais serão contrastados e os grupos/espécies chave para as áreas avaliadas serão apontados. - Interpretação preliminar da dinâmica sazonal das comunidades recifais bentônicas no período de 12 meses - Interpretação preliminar da dinâmica sazonal da saúde das colônias dos corais no período de 12 meses de amostragem. 	
<ul style="list-style-type: none"> - Interpretação preliminar sobre os parâmetros medidos nos rodolitos 	Gilberto Amado Filho

<p>e sobre as quantificações nas imagens.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Interpretação preliminar sobre a abundância de organismos construtores/não construtores, composição de grupos/espécies e produção de CaCO₃ nos CAUS - Interpretação preliminar das composições de espécies 	
<ul style="list-style-type: none"> - Interpretação da composição do material sedimentar buscando identificar sua fonte e relacionar com os parâmetros físicos do período 	Alex Cardoso Bastos
<ul style="list-style-type: none"> - Interpretação dos citogramas, contrastando locais e a sazonalidade - Interpretação preliminar da dinâmica sazonal das comunidades planctônicas associadas a formações recifais no período de 12 meses 	Paulo Salomon
<ul style="list-style-type: none"> - Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes. 	Rodrigo Moura e Gilberto Amado Filho

6. METODOLOGIA

Abordagem geral: O monitoramento contempla análises trimestrais nos fundos recifais, rodolitos e macroalgas, nos pontos pré-estabelecidos no TR. Eventualmente, poderá haver ajustes de localização dos pontos, considerando as incertezas das coordenadas em relação a fundos recifais e rodolitos. O trabalho irá abranger: **i)** caracterização de comunidades bentônicas a partir de estimativas do percentual de cobertura de diferentes grupos de organismos bentônicos (ênfase em corais, recrutas de corais e algas), **ii)** avaliação do estado de saúde de corais (prevalência de branqueamento e doenças, densidade de zooxantelas e eficiência fotossintética, etc.), **iii)** determinação das taxas de sedimentação e composição do material sedimentar. As amostragens serão realizadas nos fundos recifais potencialmente impactados por rejeitos de mineração, conforme estações determinadas no TR4 Anexo 3 e terão frequência trimestral no primeiro ano.

As amostragens quali e quantitativas em comunidades recifais bentônicas serão feitas com base em estimativas da cobertura relativa do substrato, utilizando fotoquadrados em parcelas fixas. Cada amostra será composta por um mosaico de 15 fotos contíguas, tomadas em alta resolução, totalizando 70 cm². Em cada estação serão amostrados 10 quadrados fixos em cada hábitat (e.g. topo e parede de pináculos recifais), os quais serão delimitados permanentemente por pinos metálicos fixados ao substrato. Uma avaliação piloto para determinar os detalhes do regime amostral será feita no primeiro ciclo de trabalhos de campo. As amostragens de comunidades planctônicas associadas às formações recifais serão feitas com garrafas de *niskin* e redes de diversas panagens, abrangendo frações de organismos desde o micro até o macro plâncton. Uma avaliação piloto para determinar os volumes e o regime amostral será feita no primeiro ciclo de trabalhos de campo. As amostras serão analisadas em citômetro de fluxo e câmera de fluxo (*flowcam*), após o estabelecimento de bibliotecas e de rotinas específicas para as comunidades planctônicas da área de estudo.

A aquisição de variáveis ambientais (clorofila, O.D., pH, nutrientes, temperatura e salinidade, turbidez, complexidade do fundo) nas áreas recifais será feita após a definição do regime amostral, ao longo de todo o projeto. Dados de temperatura superficial do mar serão obtidos através de imagens de satélite (e.g. NOAA AVHRR Pathfinder 5.0) e “*data loggers*” de registro contínuo na sub-superfície (5-15 m de profundidade) instalados em pontos estratégicos da malha amostral. Para os dados remotos serão utilizadas médias mensais obtidas de imagens noturnas, evitando a interferência de variações diurnas no nível de radiação solar. Serão também usadas imagens MODIS para avaliar a cor do oceano, com subsequente validação através de medidas in situ de turbidez e clorofila-a, salinidade e correntes permitindo explorar a sazonalidade desses parâmetros e possíveis relações com outras variáveis, tais como precipitação e clima de ventos e ondas. Amostras de água

do mar (10 l/amostra) serão obtidas em cada estação/período amostral para a aquisição de variáveis físico-químicas.

O estado de saúde de corais será avaliado com diferentes abordagens, incluindo medidas *in situ* com uso de fluorômetro de pulso amplificado (Diving-PAM), avaliação da coloração dos corais, e amostragens (coletas) para determinação da densidade de zooxantelas e genotipagem de simbiontes. Será registrada a prevalência de branqueamento e doenças, a partir das imagens dos fotoquadrados e complementarmente, será acessado o Rendimento de Fluorescência (F) e o Máximo Rendimento (Fm) das zooxantelas associadas aos corais, parâmetros que representam *proxies* de sua saúde. Além disso, a comunidade microbiana associada aos corais será acessada ao longo do gradiente de influência da descarga do Rio Doce, contribuído para a detecção de possíveis impactos. O delineamento espacial e a frequência amostral desse componente serão compatível com as amostragens quali-quantitativas das comunidades bentônica e planctônica, e será definido após o primeiro ciclo piloto de amostragens, ao longo do primeiro ano.

Taxas de sedimentação e composição do sedimento serão determinadas com uso de armadilhas de sedimento instaladas em pontos fixos, distribuídos ao longo da malha amostral nos sistemas recifais. As taxas de sedimentação e a composição do material sedimentar em áreas recifais sob distintas forçantes serão determinadas em diferentes escalas espaciais e temporais, a partir de visitas periódicas às armadilhas trimestrais. Serão utilizadas pelo menos cinco armadilhas de sedimento, instaladas na superfície dos recifes. A disposição dessas estações será efetuada ao longo do gradiente de influência da descarga do Rio Doce e com base na caracterização das comunidades bentônicas. Em cada recife monitorado com armadilhas de sedimento. O material coletado nas armadilhas será analisado para determinação da composição mineralógica e granulometria.

Macroalgas e rodolitos serão coletadas nos pontos amostrais dispostos ao longo da APA Costa das Algas e do RVS de Santa Cruz, conforme o Anexo 3 do TR4. A coleta será com busca fundo *van veen* ou draga. Em algumas estações, imagem de alta resolução poderão ser utilizadas para quantificação de índices de vitalidade e densidade, substituindo assim a coleta de amostras. Em cada estação, um total de até 30 rodolitos serão coletados. A frequência de amostragem é trimestral. A análise dos rodolitos inclui forma, vitalidade, taxonomia das algas formadoras e densidade. Análise taxonômica será realizada nas macroalgas.

Unidades de calcificação (CAU) serão instaladas, no número máximo de 10, nos fundos de rodolito e nas áreas recifais. Cada CAU deverá ser instalado e retirado dentro do período de 12 meses. A composição e a abundância dos organismos colonizados nas estruturas serão descritas e quantificadas. Nos locais de instalação dos CAUs deverão ser também instalados *dataloggers*, os quais fornecerão um registro acurado da temperatura durante todo o período de incubação das placas em cada sítio.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES,
ESTUARINA E MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)**

SUB-PROJETO: MAPEAMENTO E MONITORAMENTO DE HABITATS MARINHOS

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Doutor II - Alex Cardoso Bastos	Coordenador	UFES
Doutor II - José Antônio Baptista Neto	Pesquisador associado	UFF
Pós-Doutorado - Danielle Peron	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado - Valquíria Aguiar	Pesquisador	UFF
Profissional Mestre II - Geandré Boni	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre I - Fernanda Vedoato	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre I - Ana Carolina Lavanigno	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

O escopo do projeto envolve a o mapeamento do depósito sedimentar produzido pelo aporte de lama de rejeito, englobando o mapeamento dos habitats adjacentes a foz do Rio Doce e a determinação e caracterização sedimentológica e geoquímica da espessura dos depósitos considerados antropogênicos (impactos com aumento de teores de metais e orgânicos, mudança do aspecto sedimentológico/mineralógico, etc). Dentro deste escopo, a metodologia básica será a aplicação de métodos geofísicos para mapeamento do depósito e coleta de testemunhos rasos para sua caracterização. Basicamente o foco do projeto é entender o que é o depósito produzido pelo aporte de lama de rejeito, qual a sua espessura, quais as taxas de acumulação, suas características sedimentológicas/mineralógicas e geoquímicas e qual a extensão desta deposição e o potencial impacto nos habitats mais sensíveis, como fundos de rodolitos, fundos recifais e fundos explorados comercialmente.

3. OBJETIVO

O objetivo desse projeto é investigar e caracterizar os principais habitats marinhos adjacentes à foz do Rio Doce bem como entender a distribuição e espessura dos depósitos sedimentares formados a partir do evento de rompimento da barragem de rejeito de minério em Minas Gerais e sua interação com os principais habitats.

Objetivos específicos:

1. Mapear os habitats marinhos adjacentes a foz do Rio Doce;
2. Definir a espessura do depósito formado na plataforma continental;
3. Caracterização sedimentológica, mineralógica e de geoquímica de metais do depósito;
4. Identificar áreas preferenciais de acúmulo do rejeito;
5. Identificar os habitats potencialmente impactados pelo aporte de rejeito
6. Vídeo-Monitoramento dos principais habitats

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

META 1- Definição da Espessura do Depósito, Taxas de Sedimentação, e Acúmulo do Rejeito

Determinar a espessura do depósito sedimentar associado a foz do Rio Doce e caracterizar o acúmulo do depósito de rejeito e sua comparação sedimentológica, mineralógica e geoquímica com o registro sedimentar.

META 2- Mapeamento de Habitats

Mapear o fundo marinho ao longo das três áreas definidas no TR4 definindo 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.

META 3- Vídeo-Monitoramento dos Habitats

Monitorar a variabilidade do fundo marinho através de imagens a serem coletadas ao longo de transectos. A meta busca verificar variações no aporte sedimentar, ou mudanças nos processos de sedimentação que possam influenciar diretamente na comunidade bentônica.

META 4- Integração dos Dados

Esta meta tem como objetivo integrar todos os dados deste projeto de mapeamento, mas também incorporar os dados que serão coletados no monitoramento ambiental e na caracterização dos fundos recifais e de rodolitos. Esta integração começa com a consolidação de dados já existentes para uma única base de informação geográfica. O objetivo desta meta é entender a distribuição dos habitats e avaliar o potencial impacto causado a cada um deles.

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>
Mapa de Batimétrico de 3 áreas Mapa de Habitats de 3 áreas Descrição dos parâmetros granulométricos, mineralógicos, composição geoquímica de 10 testemunhos Mapa de isópacas do depósito Vídeo-transecto do fundo marinho	Alex Cardoso Bastos
Lista de parâmetros de metais nas amostras sedimentares dos testemunhos	José Antônio Baptista Neto

5.2. ANÁLISE DE DADOS	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
- 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 e estrutura. - Variabilidade temporal do fundo marinho de cada habitat buscando mostrar mudanças na sedimentação, soterramento de fundos de rodolitos, mudança na vitalidade destes fundos e qualquer interferência observada. - Determinação, em alta resolução, da espessura do depósito sedimentar na foz do Rio Doce	Alex Cardoso Bastos
- Determinação da variação da concentração de metais no perfil estratigráfico obtido a partir dos testemunhos sedimentares	José Antônio Baptista Neto

6. METODOLOGIA

META 1- Definição da Espessura do Depósito, Taxas de Sedimentação, e Acúmulo do Rejeito

Esta meta envolve a perfilagem acústica do sub-fundo marinho. São linhas a cada 10km entre a Aracruz e São Mateus. Na região da foz do Rio Doce, as linhas deverão ser feitas a cada 5km. A área de levantamento será definida considerando a região de maior espessura e potencial acúmulo de rejeito na foz do rio. A aquisição dos dados sísmicos será realizada com uma fonte de frequência entre 0,5 e 10kHz, capaz de penetrar no fundo marinho e ter resolução suficiente de pelo menos 1m. O processamento do dado sísmico será feito nos softwares Seismic Unix, Sonarwiz 7 e Meridata MDPS. A interpretação irá produzir a digitalização de refletores que serão posteriormente exportados para produção de um ou vários mapas de isópacas.

Com base na interpretação sísmo-estratigráfica, os pontos de testemunhagem serão definidos, sempre buscando os locais de maior acúmulo sedimentar na foz do Rio Doce. A coleta será realizada por testemunhador a gravidade, com um máximo de recuperação de até 1,5m. Um total de 10 pontos serão

definidos considerando os resultados da sísmica e a base de dados pretérita que poderá indicar a presença ou não de sedimento oriundo do rejeito. A partir desta definição, a área de distribuição dos testemunhos será definida. Uma vez coletados, os testemunhos serão processados para obtenção das análises granulométricas, mineralógicas, composicionais e de geoquímica de metais, além da determinação das taxas de sedimentação por Pb210. A metodologia de análise está descrita no TR4 e será totalmente executada conforme lá definido.

META 2- Mapeamento de Habitats

O escopo desta meta é o mapeamento de habitats de 3 áreas já definidas no TR4. Estas 3 áreas serão mapeadas com batimetria de varredura e coleta de verdade de campo através de imagens de alta resolução a serem obtidas por ROV ou equipamentos similares. Em havendo necessidade, sedimentos de fundo serão coletados com busca-fundo van veen.

O Termo de Referência 4, no seu Anexo 3, já aponta para as 3 áreas prioritárias, porém a análise inicial dos dados pretéritos irá redefinir o tamanho destas áreas, buscando uma melhor caracterização dos habitats. A proposta é que estas áreas não tenham tamanho superior a 20x20km. A região a ser mapeada também irá levar em consideração a distribuição dos pontos que fazem parte do monitoramento integrado. O levantamento será realizado com um sistema de multibeam que será comprado no âmbito do 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 vídeo transectos de 2km de comprimento em todos os habitats mapeados. Os transectos serão realizados com veículos do tipo ROV ou estruturas compatíveis como dropcameras ou pranchas. Os vídeos devem ter resolução de 4k para melhor identificação dos tipos de fundos e biota associada.

Em havendo necessidade, amostras de fundo poderão ser coletadas com busca-fundo van veen e serão analisadas para granulometria.

O processamento dos dados de batimetria de varredura será realizado nos softwares Caris e Quimera. Os dados de backscatter serão processados visando o mapeamento dos tipos de fundo. A parametrização a partir da verdade de campo será feita através da relação dos índices de backscatter com os resultados das análises de imagem. Análises multivariadas e de agrupamento serão usadas para definição das classes de habitats. O processamento das imagens de vídeos seguirá o que está definido no TR4.

META 3- Vídeo-Monitoramento dos Habitats

Uma vez definidos os habitats, transectos a cada 5km serão realizados dentro de cada área mapeada na Meta 2. Os transectos serão feitos trimestralmente com o objetivo de imagear possíveis variações no padrão de sedimentação ou alteração na biota. A análise e interpretação deverá ser sempre comparativa com aos dados anteriores.

META 4- Integração dos Dados

A metodologia para esta meta estará inserida no processo de integração dos dados, principalmente em relação aos resultados do monitoramento marinho integrado (por isso é importante que as áreas a serem mapeadas contenham pontos de monitoramento). A caracterização do habita deve ter ainda parâmetros físico-químicos da água e de hidrodinâmica.

ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA E
MARINHA (ANEXO 3 - MARINHO)

SUB-PROJETO: MODELAGEM NUMÉRICA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Renato David Ghisolfi	Coordenador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

A partir das amostragens já realizadas na região, foi identificado o papel primordial que a vazão do rio desempenha neste sistema. A amostragem realizada logo após a chegada do material no mar (26/11 a 30/12/2015) ocorreu quando a vazão do rio estava baixa em função do período de estiagem e, em função da alta concentração do material em suspensão, houve um impacto agudo. O padrão do espalhamento da pluma respondeu ao padrão da circulação de larga escala modificado pela maré e pelo campo de ondas e se alternou entre norte e sul ao longo da costa em função das entradas frequentes de frentes frias na ocasião, indicando que a dinâmica se altera rapidamente, principalmente na plataforma continental interna. Nas amostragens subsequentes, durante um período de alta precipitação e de ocorrência de ventos nordeste atuando por longo período (28/11/2015 a 02/02/2016), foi identificada a ocorrência de uma ressurgência costeira completa como resultado das características de duração e intensidade da tensão de cisalhamento superficial. O forte gradiente térmico que se estabeleceu na região condicionou o padrão hidrodinâmico de dispersão da pluma de sedimentos oriundos do rio.

Um aumento na descarga continental aliada às tensões de cisalhamento de vento nordeste menos intensas não produz uma ressurgência completa, mas resultam em um oceano estratificado em duas camadas com uma forte pycnoclina separando águas superficiais mais quentes das águas frias abaixo da pycnoclina. Um padrão distinto deve ocorrer no inverno (estação seca), embora não tenham sido realizadas coletas *in situ* nesta estação.

Medidas de correntes realizadas com ADCP de casco durante a segunda pernada das coletas realizadas com o NOc Vital de Oliveira mostraram correntes nordeste em um aparente desacoplamento com o padrão superficial de vento que também era nordeste, sugerindo que a dinâmica de mesoescala deva ser considerada nesta região da plataforma continental capixaba.

A coleta de dados *in situ* é essencial para avaliar a dinâmica oceanográfica na região. Também são importantes na validação do desempenho dos modelos numéricos e dos dados obtidos por sensoriamento remoto. Uma vez que a coleta de dados oceanográficos *in situ* possuem alto custo de aquisição e demanda de tempo, a modelagem numérica e o sensoriamento remoto tornam-se ferramentas essenciais para a identificação e entendimento da dinâmica em distintas escalas espaciais e temporais possibilitando o acompanhamento dos impactos e seus efeitos. O modelo proposto neste monitoramento é o ROMS (Regional Ocean Modeling System) associado ao módulo biogeoquímico FENNEL, para avaliar o impacto na porção biológica, geológica e química do ambiente marinho receptor final do rejeito vazado.

Finalmente, deve-se utilizar o sensoriamento remoto, uma fonte de dados sinópticos com o qual é possível avaliar o campo térmico e a biomassa fitoplanctônica espacial e assim inferir o desenvolvimento do campo vertical, bem como a dispersão da pluma de sedimentos.

3. OBJETIVO

Avaliar e caracterizar a dinâmica oceanográfica desta região da plataforma continental adjacente à foz do Rio Doce, relacionando-a às condições atmosféricas locais e regionais, a partir da coleta e análise de dados *in situ*, *ex situ* (satélite), além da modelagem numérica a fim de entender o controle que essas forças exercem sobre a dinâmica da dispersão de sedimentos oriundos dos rejeitos vazados.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Levantamentos de dados *in situ* (mensal, trimestralmente e semestralmente):

A coleta de dados *in situ* é necessária para avaliarmos o impacto que o ambiente marinho está sendo submetido com a chegada da lama de rejeitos ao mar. Ao mesmo tempo, estaremos coletando dados para avaliar o padrão meteorológico e oceanográfico e entendermos como a dinâmica oceanográfica condiciona o destino desse rejeito no mar.

Meta 2- Fundeio

Dois aspectos principais justificam a necessidade dos fundeios oceanográficos: 1- a necessidade de obtenção de séries temporais de alta resolução temporal para se avaliar (mesmo que pontualmente) a dinâmica do sistema oceanográfico e 2- a necessidade de obtermos dados de correntometria. A junção dos dados oriundos dos vários fundeios permitirá que se construa um cenário dinâmico, além de possibilitar a validação dos resultados da modelagem numérica.

Meta 3- Modelagem numérica

Os resultados do modelo numérico (hidrodinâmico + biogeoquímico) permitirão uma visualização sinótica do sistema tridimensional da área em alta resolução temporal e espacial. Assim, uma vez validados os resultados serão possíveis se acompanharem a evolução temporal da dinâmica oceanográfica.

Meta 4- Sensoriamento Remoto

Com os dados oriundos do sensoriamento remoto (ex., Temperatura da Superfície do Mar, cor verdadeira do oceano, concentração de clorofila-a etc.) será possível acompanhar, sinoticamente, a evolução temporal das feições térmicas, da pluma de sedimentos e dos efeitos na porção fitoplanctônica da cadeia trófica. Esses dados também auxiliarão na validação dos resultados dos modelos hidrodinâmico e biogeoquímico.

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>
<i>In situ</i> (Campanhas e Fundeios) Temperatura Salinidade Turbidez Fluorescência Correntometria Elevação do nível do mar Simulação Numérica (resultados diários) Campos termohalinos Campos de velocidade de corrente Campos de nutrientes (nitrato e amônia) Campos de fitoplâncton e zooplâncton Campos de clorofila-a e oxigênio dissolvido Mapa da distribuição de sedimento superficial e de fundo	Renato David Ghisolfi

Sensoriamento Remoto Compilação de imagens válidas de Temperatura da Superfície do Mar Compilação de imagens válidas de Clorofila-a Compilação de imagens válidas de Cor verdadeira	
--	--

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Caracterização do padrão hidrodinâmico e termohalino na plataforma continental adjacente a foz do Rio Doce Análise do espalhamento do sedimento superficial e de fundo associados à vazão do Rio Doce Análise da distribuição dos parâmetros biogeoquímicos sobre a plataforma continental Identificação e caracterização de processos de meso-escala (ex., ressurgência costeira) Distribuição espaço-temporal da pluma de sedimentos do Rio Doce, Clorofila-a e Temperatura superficial do mar	Renato David Ghisolfi

6. METODOLOGIA

Levantamento *in situ* mensal, trimestral e semestral

Coleta

Na amostragem *in situ* em cada estação amostral deverão ser obtidos perfis verticais de dados termohalinos (temperatura e condutividade), de pressão, fluorescência ou concentração de clorofila-a, turbidez e, se disponível, também oxigênio. O turbidímetro deve estar calibrado para leituras entre 0 e 100 NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez).

Processamento dos dados em laboratório

Os dados hidrográficos obtidos por um CTD serão tratados com o auxílio do *software* Matlab®. Esse procedimento assegurará 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.
- **Alinhamento:** Inclui a correção da diferença entre os tempos de resposta dos sensores de condutividade e oxigênio em relação à pressão para garantir que todos os parâmetros se tratam da mesma parcela de água;
- **Binagem:** Médias verticais dos dados a cada 1 dbar de coluna de água de forma que os perfis termohalinos fiquem equi-espaçados verticalmente.

Em seguida, os dados termohalinos passarão por um alisamento por janela móvel que consiste na substituição dos valores de temperatura e salinidade 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).

Após o pré-processamento descrito acima os dados serão analisados por meio de seções horizontais e verticais e de estações individuais de modo que se estabeleçam cenários que auxiliem na compreensão de como a dinâmica oceanográfica local condiciona o padrão de distribuição e destino final do rejeito no ambiente marinho.

Modelo

Implementação

O modelo oceânico tridimensional ROMS (*Regional Ocean Modeling System*, <http://www.myroms.org>, Haidvogel et al., 2000; Marchesiello et al., 2001) será utilizado para evidenciar processos de pequena e mesoescala ao longo da plataforma continental do Espírito Santo e oceano adjacente. Duas simulações numéricas de distintas resoluções espaciais serão utilizadas. Na primeira, a resolução espacial será de $1/24^\circ$ (~4,6 km) e 40 níveis sigma, cobrindo a região de 44° e 33°O e 13° e 26°S . Nela serão implementadas forçantes datadas a partir de outubro de 2008. Aninhada a esta grade será implementado o *nesting online two-way*, a uma segunda grade numérica agora com resolução espacial de $1/120^\circ$ (~0,9 km) com foco sobre a plataforma do ES entre o Banco de Abrolhos e o sul do Estado. Esta segunda simulação iniciará em janeiro de 2013. A batimetria a ser utilizada derivará dos dados do GEBCO (*General Bathymetric Chart of the Oceans*) com resolução espacial de 30 arco segundo. Esses dados deverão ser suavizados e complementados/ajustados com dados medidos *in situ* sobre a plataforma continental da região.

As condições de contorno Radiation/Nudging serão impostas para os traçadores (temperatura/salinidade), bem como para as componentes baroclínicas, e as condições de Flather para as condições barotrópicas, com o modo explícito de Chapman para a superfície livre. O Nudging será aplicado em 30 pontos de contorno de cada grade, durante 5 dias nos contornos. Uma camada de esponja de 25 pontos de grade será implementada nos contornos abertos (norte, sul e leste), onde o coeficiente de viscosidade horizontal deverá ser mantido constante em $50 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. O modelo de fechamento turbulento a ser utilizado deverá ser o *Generic Length Scale* (GLS vertical mixing) (Umlauf e Burchard, 2003), o qual foi introduzido ao ROMS por Warner et al. (2005). O cisalhamento de fundo será parametrizado usando-se a lei de arrasto de fundo quadrático, com um valor de $C_D = 3 \times 10^{-3}$.

As forçantes atmosféricas aplicadas a ambos os experimentos serão provenientes da reanálise do CFSR/NCEP (*Climate Forecast System Reanalysis*, Saha et al., (2010)), o qual possui resolução espacial de $0,3^\circ$ a cada 6h, aplicado através de todo o domínio. As condições de contorno laterais alimentadas ao domínio de menor resolução espacial serão provenientes do modelo oceânico global HYCOM-NCODA (*Hybrid Coordinate Data Assimilation-Navy Coupled Ocean Data Assimilation*, Wallcraft et al. (2009)), com uma resolução horizontal de $1/12^\circ$ (~9,2 km). As principais constituintes diurnas e semidiurnas (M_2 , S_2 , N_2 , K_2 , O_1 , Q_1 , K_1 , P_1 , M_f e M_m) da maré serão também aplicadas às condições de contorno laterais, com dados provenientes do modelo global TPXO do Atlantic Ocean-ATLAS, com resolução horizontal de $1/12^\circ$.

Na segunda simulação numérica será avaliada a dispersão da pluma do Rio Doce tendo como base a distribuição halina na plataforma continental. A princípio, serão utilizados dados médios diários de vazão da estação de Colatina/ES distribuídas exponencialmente ao longo da coluna d'água em um canal estuarino de distante ~90 km da foz do rio.

Os resultados do modelo hidrodinâmico aliados ao da climatologia do WOA (*World Ocean Atlas*) 2013 também alimentarão o modelo biogeoquímico Fennel (Fennel et al., 2006a, 2008a), o qual descreve de forma simplificada o ciclo do nitrogênio com sete variáveis de estado: nitrato, amônia, fitoplâncton, zooplâncton, detritos pequenos e grandes, e clorofila-a (Fennel et al., 2006). O oxigênio dissolvido foi adicionado ao modelo original como uma variável de estado como descrito em Fennel et al. (2013). Os detalhes do modelo podem ser obtidos em Fennel et al. (2006, 2013). As constantes dos parâmetros do modelo serão mantidas como em Fennel et al. (2011, 2013). O modelo biogeoquímico Fennel foi utilizado com sucesso em estudos envolvendo o papel da plataforma continental no ciclo do nitrogênio (Fennel, 2010), nas de condições de hipoxia (Fennel et al., 2013; Fennel et al., 2016) e nos impactos do ferro na produção fitoplanctônica (Fennel et al., 2003).

As variáveis biológicas como amônia, fitoplâncton, clorofila-a, zooplâncton e detritos e as concentrações de NO_3 e oxigênio dissolvido serão inicializadas com valores climatológicos de acordo com os dados globais do WOA 2013 e os dados obtidos *in situ*. Para simular os efeitos que a pluma do Rio Doce causa sobre o ciclo do nitrogênio na plataforma continental, serão utilizadas concentrações base de NO_3 na

forçante fluvial de acordo com dados primários obtidos *in situ* antes da chegada da lama de rejeitos no mar. Os resultados do modelo servirão para analisar, juntamente com as imagens de satélite, os processos de ressurgência costeira com enriquecimento de nutrientes (também oriundas da descarga continental) e a floração fitoplanctônica.

Resultados e processamento

No processamento dos resultados será realizada uma análise de campos e seções verticais das diferentes variáveis dos resultados numéricos (temperatura, salinidade, velocidade, etc). Essas análises compreenderão estatísticas básicas dos diferentes campos (médias, desvio-padrão, variância, etc), bem como a análise de campos instantâneos de condições oceanográficas, análise de eventuais padrões sazonais e variabilidade interanual. As análises serão focadas (mas não limitadas a) às condições oceanográficas de superfície e fundo da região, visando melhor compreender a dispersão e o transporte de sedimentos, nutrientes e plâncton na foz do Rio Doce.

Durante as simulações numéricas serão implementados fundeios virtuais quando serão armazenados dados horários de temperatura, salinidade, componente zonal e meridional da velocidade em diferentes profundidades e elevação da superfície do mar. Inicialmente, deverão ser contempladas as 38 estações onde já foram realizadas coletas de dados em campanhas anteriores na região, além dos pontos de fundeios descritos neste documento. Serão feitas comparações entre os resultados numéricos obtidos a partir dos fundeios virtuais com os dados *in situ* obtidos a partir dos cruzeiros e fundeios. As séries temporais serão decompostas em diferentes escalas temporais de maneira a poder avaliar a capacidade do modelo de reproduzir os diferentes processos que ocorrem na região, como as correntes de maré, correntes induzidas pelo vento, ressurgência, entre outros.

A metodologia de processamento das séries temporais dos fundeios virtuais será a mesma contemplada no item **Fundeios** descrito a seguir.

Fundeios

Implementação

Um total de quatro linhas de fundeio serão instaladas prioritariamente na região do entorno da foz do Rio Doce. Nelas deverão ser obtidas medidas de ondas, correntes, dados termohalinos e, no mínimo fluorescência e turbidez. A linha de fundeio deverá contemplar, pelo menos, uma medição junto ao fundo e outra próxima a superfície.

Uma vez que houve a redução de 5 para 4 linhas de fundeio no total, poderá haver alteração na localização dos pontos originalmente propostos sem, contudo, se alterar a essência do planejamento original.

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). Essas análises serão feitas relacionando 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 fundeios.

Associadas às medições de correntes, serão realizadas medições de ondas de gravidade superficiais quando deverão ser obtidos os principais parâmetros de onda (altura significativa, período e direção de pico) a partir do cálculo do espectro cruzado das componentes cartesianas de velocidade e da pressão.

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.

Sensoriamento remoto

O sensoriamento remoto será desenvolvido em três níveis, isto é, a partir do uso de, pelo menos, dois conjuntos de imagens de satélite: temperatura da superfície do mar e cor verdadeira/clorofila-a. Em laboratório será realizado um processamento dessas imagens e a união dessas informações resultará em uma avaliação da dispersão espaço-temporal da pluma de sedimentos e/ou da sua influência, por exemplo, na cadeia trófica marinha.

A avaliação dos ciclos de variações espaço-temporais de biomassa fitoplanctônica superficial será realizada com o emprego da técnica *Empirical Orthogonal Function* (EOF) sobre as imagens de concentração superficial de clorofila-a. Após isso, esses ciclos poderão ser associados aos ciclos de variações de forçantes físicas, tais como a vazão do Rio Doce e/ou a circulação oceânica de pequena e meso-escala.

Com os referidos ciclos definidos, se empregará o uso do estudo fenológico sobre esses dados com o objetivo de se quantificar o início e fim dos períodos de alta biomassa fitoplanctônica, ou floração, e os momentos de concentração máxima de microalgas.

Paralelamente às análises de EOF e de fenologia, as imagens de TSM serão correlacionadas às imagens de concentração de clorofila-a, visando observar a existência de associações entre padrões espaço-temporais de variação conjunta por meio da técnica *Singular Value Decomposition* (SVD). Essa análise permitirá quantificar a influência da temperatura da superfície do mar sobre a concentração das microalgas.

Imagens de cor verdadeira também serão utilizadas na identificação visual (qualitativa) da pluma de sedimentos oriunda do rio. Por meio dessas imagens serão avaliadas as áreas de ação superficial da pluma, bem como seus deslocamentos.

Por fim, os dados obtidos via sensoriamento farão parte do banco de dados utilizados na calibração do modelo proposto no referido tópico.

7. INTEGRAÇÃO COM OS DEMAIS PROJETOS

O entendimento da dinâmica oceânica nas suas distintas escalas espaço-temporais é vital e serão usados para a compreensão dos padrões e na dinâmica tanto biológica (porção planctônica: fito, zoo e ictioplâncton, ictiologia e bentos), quanto química (hidrogeoquímica), e geológica (sedimentologia, fundos recifais, monitoramento de praia) para citar alguns. Igualmente, as informações geradas por esses projetos são fundamentais para corroborar os achados físicos. Igualmente, para um melhor entendimento dos processos físico são necessários dados da porção dulcícola, principalmente vazão, turbidez e material particulado.

A união destas informações permitirá o entendimento da dinâmica associada a pluma de rejeitos nas suas distintas áreas.

8. REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FENNEL, K.; ABBOTT, M. R.; SPITZ, Y. H.; RICHMAN, J. G.; NELSON, D. M. Impacts of iron control on phytoplankton production in the modern and glacial Southern Ocean. **Deep-Sea Res. II**. v. 50, p. 833-851, 2003.

FENNEL, K. The role of continental of continental shelves in nitrogen and carbon cycling: Northwestern North Atlantic case study. **Ocean Sci.** v. 6, p. 539-548, 2010.

FENNEL, K.; WILKIN, J.; LEVIN, J.; MOISAN, J.; O'REILLY, J.; HAIDVOGEL, D. Nitrogen cycling in the Mid Atlantic Bight and implications for the North Atlantic nitrogen budget: results from a three-dimensional model. **Glob. Biogeochem. Cycles**. v. 20, GB3007, 2006.

FENNEL, K.; HETLAND, R.; FENG, Y.; DiMARCO, S. A coupled physical-biological model of the Northern Gulf of Mexico shelf: Model description, validation and analysis of phytoplankton variability, **Biogeosciences**. v. 8, p. 1881-1899, 2011.

FENNEL, K.; HU, J.; LAURENT, A.; MARTA-ALMEIDA, M.; HETLAND, R. Sensitivity of hypoxia predictions for the Northern Gulf of Mexico to sediment oxygen consumption and model nesting, **J. Geophys. Res. Oceans**. v. 118, p. 990-1002, 2013.

FENNEL, K.; LAURENT, A.; HETLAND, R.; JUSTIC, D.; KO, D. S.; LEHRTER, J.; MURRELL, M.; WANG, L.; YU, L.; ZHANG, W. Effects of model physics on hypoxia simulations for the northern Gulf of Mexico: A model intercomparison. **J. Geophys. Res.** v. 121, doi:10.1002/2015JC011577, 2016.

Haidvogel, D. B.; Arango, H.; Budgell, W. P.; Cornuelle, B. D.; Curchitser, E.; Di Lorenzo, E.; Fennel, K.; Geyer, W. R.; Hermmann, A. J.; Lanerolle, L.; Levin, J.; McWilliams, J. C.; Miller, A. J.; Moore, A. M.; Powell, T. M.; Shchepetkin, A. F.; Sherwood, C. R.; Signell, R. P.; Warner, J. C.; Wilkin, J. Ocean forecasting in terrain-following coordinates: formulations and skill assesment of the Regional Ocean Modeling System. **J. Comput. Phys.** v. 227, p. 3595-3624, 2008.

Marchesiello, P.; McWilliams, J. C.; Shchepetkin, A. F. Open boundary conditions for long-term integration of regional ocean models. **Ocean Model.** v. 3, p. 1-20, 2001.

UFES, UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. Monitoramento da Influência da Pluma do Rio Doce após o rompimento da Barragem de Rejeitos em Mariana/MG - Novembro de 2015: Processamento, Interpretação e Consolidação de Dados, 2017.

Umlauf, L.; Burchard, H. A generic length-scale equation for geophysical turbulence models. **J. Marine Res.** v. 61, p. 235-265, 2003.

Warner, J. C.; Sherwood, C. R.; Arango, H. G.; Signell, R. P. Performance of four Turbulence Closure Methods Implemented using a Generic Length Scale Method. **Ocean Modelling.** v. 8, p. 81-113, 2005.

MONITORAMENTO DE POTENCIAIS IMPACTOS DO REJEITO DE MINÉRIO DE FERRO NA PRAIA E ANTEPRAIA ADJACENTES DA DESEMBOCADURA DO RIO DOCE (ANEXO 4)

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dra. Jacqueline Albino	Coordenadora do anexo Coordenadora do subprojeto Morfodinâmica Praia	DOC / UFES
Dra. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima	Coordenadora de Subprojeto (Química)	DQUI/UFES
Dra. Karla Gonçalves da Costa	Coordenadora de Subprojeto (Bentos)	CEUNES/UFES
Dra. Vanessa Simão do Amaral	Pesquisador Pós-Doutorado Bentos	CEUNES/UFES
Dr. Dieter Muehe	Pesquisador Morfodinâmica e sedimentação de praia e antepraia	DOC/UFES
Dr. Luiz Henrique Sielski de Oliveira	Pesquisador Pós-Doutorado Morfodinâmica de Praia Modelagem e Tratamento de ondas	DOC/UFES
Dra. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde	Pesquisador Doutor II Análise Química de Sedimento por AAS	DQUI/UFES
Doutor II	Especialista em Decapoda	USP
Doutor II	Especialista em Anfipoda	UFPE
Doutor II	Especialista em Moluscos	UFES
Doutor II	Especialista em Poliqueta	UFAL
Doutor II	Especialista em Poliquetas Intersticiais	UFPR
Doutor II	Especialista em Equinodermatas	UNICAMP
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES/UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES/UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	CEUNES/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	CEUNES/UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	CEUNES/UFES
Técnico de Nível Superior – MSc Maiara Krause	Geoquímica	DQUI/UFES
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	DOC/UFES
Dr. Jefferson Rodrigues de Souza	Pesquisador Pós-Doutorado Geoquímica	DOC/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES

Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	DOC/UFES
Bruna Marine Damm	Pesquisador Iniciação Científica	DQUI/ UFES
Maria Eduarda Mendes Juvenato	Pesquisador Iniciação Científica	DQUI/ UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES/UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES/UFES
Profissional Mestre	Pesquisador	DOC/UFES

2. ESCOPO

Em 5 de novembro de 2015 o rompimento da barragem de rejeitos de minério de ferro na localidade de Mariana (MG) despejou cerca de $50 \times 10^6 \text{m}^3$ de areia e lama na zona costeira do Espírito Santo, sendo aproximadamente $16 \times 10^6 \text{m}^3$ no sistema fluvial/estuarino. O evento deslocou o volume de contaminantes ao longo de quase 700 km até à foz do Rio Doce na localidade de Regência (ES) e na plataforma continental adjacente. Em 7 de dezembro, a pluma de material em suspensão se espalhou ao longo da costa em quase 80 km, sendo 57 km para o norte e 17,5 km para o sul, além de 18 km costa-à-fora, conforme dados do IBAMA publicados no G1 na edição de dezembro de 2015.

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 da região costeira. Neste sentido, a segurança ao banho/balneabilidade do litoral atingido e a fauna associada ao sistema praias necessitam ser avaliadas para que respostas sejam o mais prontamente dadas à sociedade. Através de estudos e monitoramento praias de curto e longo prazo, busca-se obter respostas para as seguintes questões:

- Qual o alcance máximo dos contaminantes ao longo da costa?
- Qual seu deslocamento ao longo do tempo?
- Quais os processos morfodinâmicos envolvidos na distribuição dos contaminantes?
- Existe a possibilidade de os contaminantes atingirem a berma alta da praia e a costa e, em caso afirmativo, em que condições de energia de onda?
- Qual a resiliência do sistema praia-antepraia para neutralizar a ação dos contaminantes ao longo do tempo nos sedimentos e na fauna bentônica?

3. OBJETIVO

O objetivo geral do projeto é avaliar a balneabilidade das areias da praia ao uso recreativo e avaliar as condições ambientais dos ecossistemas, a distribuição espacial e a magnitude dos impactos e as consequências sobre as atividades ecológicas e econômicas do litoral.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 - Avaliação da morfologia e sedimentologia praias

A caracterização morfodinâmica da praia, juntamente com a caracterização do clima de ondas, permitirá avaliar a amplitude de mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (run up) ao longo da praia e áreas de desova das tartarugas, objetivando 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

Terá a finalidade de embasar a interpretação morfodinâmica de curto e longo prazo, assim 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 da praia em função da incorporação da fração lamosa.

Meta 3 - Monitoramento da Fauna Bentônica

A principal característica biológica da região entremarés 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 avaliar os impactos provenientes do resíduo de mineração no comportamento da fauna bentônica marinha nas praias arenosas sob possível influência da pluma de sedimento, serão analisadas a distribuição espaço-temporal da meiofauna e macrofauna bentônica. Através do monitoramento dessa comunidade, associada aos parâmetros físico-químicos do sedimento, será possível identificar como e até onde os resíduos da mineração afetaram a estrutura da fauna bentônica e qual a resiliência dessa comunidade.

Meta 4 - Monitoramento da qualidade química das areias

Caracterização química das praias através do monitoramento de elementos traço nos sedimentos e/ou água. As informações obtidas serão integradas com os dados de morfodinâmica, clima das ondas e fauna bentônica para avaliar o impacto causado a este ambiente após o acidente. As informações obtidas nos estudos de morfologia e sedimentologia serão utilizadas para avaliação da mobilidade dos contaminantes químicos.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Dados que serão entregues como produtos, segundo o TR4, contemplando tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	PESQUISADOR RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Coleção de invertebrados marinhos Base de dados da fauna bentônica Densidade de organismos Riqueza taxonômica Diversidade de organismos	Karla Costa Karla Costa Vanessa do Amaral Vanessa do Amaral Vanessa do Amaral
Cotas dos perfis topobatimétricos das praias (10 perfis)	Dieter Muehe
Para os sedimentos da praia e antepraia ao longo dos 10 perfis: Classificação granulométrica	
Teores de Carbonato	Jacqueline Albino
Teores e classificação visual de minerais pesados	Jacqueline Albino
Teores de elementos traço por ICP OES e ICP-MS	Jacqueline Albino
Teores de elementos traço por AAS	Maria Tereza Carneiro

Caracterização química e mineralógica	Geisamanda Brandão Maria Tereza Carneiro Vanessa do Amaral
---------------------------------------	--

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	PESQUISADOR RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise da distribuição espacial da fauna bentônica (macro e meiofauna) na praia e antepraia das áreas adjacentes à foz do Rio Doce	Karla Costa Vanessa do Amaral
Análise das alterações meteorológicas e das condições hidrodinâmicas (forçantes)	Luiz Henrique Sielski de Oliveira
Análise espaço-temporal da variação dos sedimentos detríticos depositados (quanto à granulometria e composição) (trimestral).	Jacqueline Albino
Variação morfológica das praias/antepraias	Dieter Muehe
Discussão da variabilidade morfodinâmica das praias e do processo costeiro, considerando a integração dos dados sedimentológicos, morfológicos e hidrodinâmicos	Jacqueline Albino
Modelo de transporte de sedimentos e distribuição da energia das ondas	Luiz Henrique Sielski de Oliveira
Análise da distribuição de elementos traço, caracterização química e mineralógica ao longo das praias	Maria Tereza, Geisamanda e Jefferson Rodrigues Jacqueline Albino Karla Costa Maria Tereza
Análise e integração de dados morfodinâmicos, bentônicos e químicos e diagnóstico de contaminação das praias	Jacqueline Albino Karla Costa Maria Tereza
Análise dos resultados obtidos considerando dados pretéritos existentes	Jacqueline Albino Karla Costa Maria Tereza

6. METODOLOGIA

6.1. Estações, distribuição e sazonalidade das coletas

O monitoramento das praias adjacentes à desembocadura do rio Doce deverá ser realizado através de levantamentos de perfis topobatimétricos praias transversais à costa, com coleta de sedimentos para análises físicas, químicas e biológicas.

O levantamento dos perfis deverá ser estendido até a isóbata de 10m, onde serão obtidos, com auxílio de uma embarcação e mergulhador, dados batimétricos e de sedimentos, por meio de coleta superficial e/ou testemunhagem.

Serão estabelecidas 10 estações amostrais ao longo do litoral, conforme Tabela 1 e Figura 1. As estações ao longo da planície do rio Doce estão localizadas na área da Reserva Biológica de Comboios e, ao sul, no litoral de Aracruz, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas.

Tabela 1: Localização aproximada das estações amostrais do monitoramento do sistema praial. Coordenadas em UTM (fuso 24K).

ESTAÇÕES	LESTE	SUL
ARACRUZ 1 REFÚGIO	379867	7789122
ARACRUZ 2 PADRES	385064	7798663
DOCE SUL 1 BARRA DO RIACHO	389666	7808931
DOCE SUL 2 COMBOIOS	398484	7818546
DOCE SUL 3 REGÊNCIA	407417	7824461
DOCE NORTE 1: POVOAÇÃO	417864	7834350
DOCE NORTE 2: VILA DE CACIMBAS	426647	7857980
DOCE NORTE 3: PONTAL DO IPIRANGA	425785	7877396
DOCE NORTE 4: URUSSUQUARA	423027	7897769
DOCE NORTE 5: GURIRI	421309	7929528

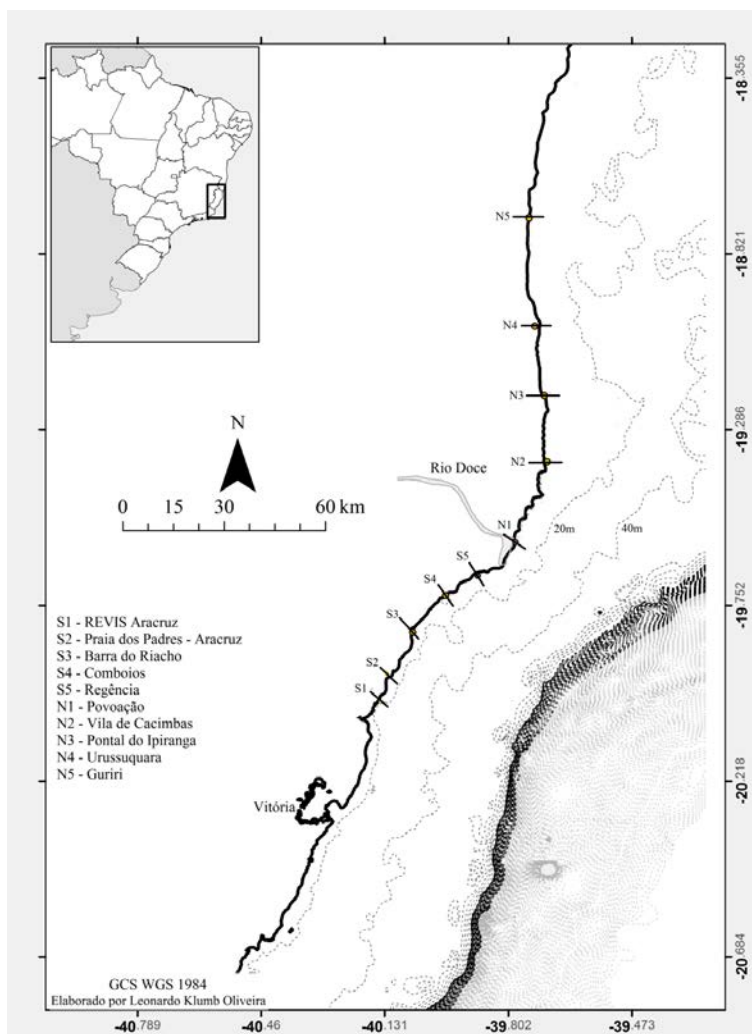


Figura 1. Representação esquemática da área de estudo, indicando as estações amostrais de coleta. Batimetria: SRTM15-Plus.

O monitoramento será realizado ao longo de 12 meses da seguinte forma:

- 4 campanhas (trimestrais) para as análises físicas e geoquímicas;
- 2 campanhas (semestrais) para a análise da comunidade bentônica, que deverão ser realizadas em maré baixa de sizígia.

Cada campanha deve representar todos os levantamentos de campo, *i.e.*, o levantamento topobatimétrico dos perfis e as coletas de sedimentos.

6.2. Análise da Morfologia e sedimentologia

6.2.1 Caracterização multidecadal do clima de ondas

Será realizada uma avaliação multidecadal do clima de ondas (60 anos) a partir das principais variáveis estatísticas, como altura significativa (h_s , (m), período de pico (T_p , (s) e direção de pico (θ°). Os dados de longo prazo serão obtidos a partir de modelos globais de ondas superficiais, como o *Global Ocean Waves* (REGUERO et al., 2012) e NOAA-WW3 (TOLMAN, 2009). Caso necessário, o comportamento do espectro de ondas será propagado para águas rasas utilizando-se modelos numéricos específicos para tal finalidade, como SMC-Brasil, Sisbahia ou Delft 3D-WAVE, com resolução de malha adequada à batimetria disponível. Os modelos serão validados a partir de comparações com dados obtidos *in situ* através de equipamentos ADCP, no âmbito do projeto.

6.2.2 Monitoramento de perfis topobatimétricos

Perfis topobatimétricos serão monitorados ao longo da costa entre as estações (UTM - WGS 1984) 379908.84/7787892.11 e 421309.00/7929528.00 e consistirão em cinco perfis ao norte e cinco ao sul da desembocadura do rio Doce.

Os perfis serão levantados a partir do limite da pós praia e se estenderão para a zona submarina até o limite da antepraia média, ou seja, até a profundidade de fechamento, em torno da isóbata de 10 m.

O levantamento dos perfis de praia será feito por meio de posicionamento espacial e altimétrico por meio de posicionamento em tempo real (GPS RTK) ou outros métodos, como nivelamento topográfico por meio de estação total, nível ou teodolito. A utilização do RTK subentende a colocação de marcos geodésicos ao longo do litoral em estudo, os quais servirão de base de correção de coordenadas X, Y, Z. Estes dados deverão ficar disponíveis para a Universidade.

O levantamento da zona submarina (antepraia) deverá ser feito por meio de embarcação apropriada à dinâmica de onda (jet ski, traineira ou lancha) com posicionamento por GPS RKT empregando ecobatimetria monofeixe de dupla frequência, para definir a profundidade e a espessura da camada de lama.

A acoplagem do perfil da praia com o da antepraia será feita empregando metodologia proposta por Muehe (2004) e consiste em transportar a cota altimétrica definida para o perfil de praia, por meio de ajuste à previsão maregráfica (MUEHE et al., 2003), por nivelamento desta cota à profundidade da posição da embarcação com a colocação de uma mira topográfica ao lado da embarcação. Isto irá permitir ajustar o registro batimétrico à altimetria do perfil de praia.

A determinação do estágio morfodinâmico praiar (SHORT & WRIGHT 1984), será utilizada como indicação de sua variabilidade topográfica, a partir de observações de altura (Hb) e período da onda (T) na arrebentação e sua comparação com a distância (Dup) e duração (Tup) do espraiamento da onda na face da praia, através da equação proposta por Muehe (1998):

$$\square = [(sen \square Dup)/Hb]/(Tup/T)$$

Dados morfológicos serão utilizados na determinação do *run up* e potencial de inundação da praia.

6.2.3 Análise Sedimentológica

Ao longo dos perfis topobatimétricos serão abertas trincheiras de aproximadamente 1m e coletados testemunhos na feição da berma, onde as areias permanecem mais tempo e a mobilidade é menor. Na feição da face praiar, as coletas serão subsuperficiais, com trincheiras de até 20cm em cada campanha. Na antepraia, um testemunhador será utilizado para coleta subsuperficial. Coletas superficiais serão realizadas utilizando-se draga tipo Van Veen. Possivelmente as coletas serão apoiadas por um mergulhador.

Os sedimentos das diferentes camadas sedimentares identificadas serão analisados quanto à granulometria e composição. Deverá ser realizada outra coleta, nos mesmos pontos, para as análises geoquímicas e outra para análises da macro e meio fauna.

As análises granulométricas deverão ser realizadas com auxílio de um granulômetro (análise a laser). As amostras dos sedimentos deverão passar por uma preparação prévia que consiste em lavagem, secagem, quarteamento e extração, e posterior quantificação, da matéria orgânica. Os parâmetros estatísticos granulométricos serão determinados a partir do proposto por Folk & Ward (1957) utilizando o programa livre GRADISTAT (BLOTT & PYE, 2001).

As análises composicionais constituirão na determinação dos teores e composição dos carbonatos, caso abundantes, e na determinação dos teores e composição dos minerais pesados. Os minerais pesados serão separados da fração leve por separação dessimétrica, de acordo com Dias (2004) e a identificação será realizada em lupas, conforme proposto por Addad (2001).

6.2.4 Integração morfodinâmica

A partir das informações morfológicas e sedimentológicas será identificado o gradiente topográfico submarino e realizada a comparação com o perfil de equilíbrio teórico. Será avaliado a distribuição e espessura da deposição de lama, caso presente, sob o substrato arenoso e sua atuação na morfodinâmica praiar.

A caracterização da morfodinâmica da praia e do clima de ondas permitirá avaliar a amplitude de mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (*run up*) a partir de modelos como os propostos por Stockdon et al. (2006) e Sallenger et al. (2002) ao longo da praia. Esta informação auxiliará na determinação da vulnerabilidade das praias quanto a mobilidade, potencial de inundação e possibilidade de contaminação nas áreas de proteção, como a região de restinga.

O monitoramento permitirá compreender as alterações morfodinâmicas, adaptação e resiliência do sistema praiar em função da incorporação, mobilização e redistribuição da fração lamosa incorporada às praias.

6.3 Monitoramento da Fauna Bentônica

Para o monitoramento da estrutura da comunidade de invertebrados bentônicos marinhos ocorrerão duas coletas (semestrais) para amostragens de meiofauna e macrofauna nas praias do litoral norte do Espírito Santo. O objetivo do monitoramento é avaliar os impactos provenientes do resíduo de mineração no

comportamento da fauna bentônica marinha em praias arenosas sob possível influência da pluma de sedimento. Nessa região, algumas áreas já possuem dados anteriores que serão usados para fins de comparação.

6.3.1 Procedimentos de campo

Coletas semestrais serão realizadas em dez estações amostrais distribuídas ao longo do litoral norte do Espírito Santo, em diferentes faixas de praia: antepraia (infralitoral), face praial (mesolitoral) e na berma (supralitoral), sempre em maré baixa de sizígia, não ultrapassando cinco dias subsequentes de coletas. Em cada estação, serão realizados três transectos, onde serão coletadas amostras em três níveis: supralitoral, mesolitoral e infralitoral. O mesolitoral será o local que compreende a distância entre a linha da mare 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 1m. Será coletada uma amostra de macrofauna e uma amostra de meiofauna em cada um dos níveis de cada transecto, totalizando 9 amostras de cada componente bentônico por estação amostral (as amostras serão coletadas em triplicata em cada faixa de cada ponto).

As amostras serão tomadas com coletores cilíndricos (para a macrofauna - 15 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade; para a meiofauna - 2 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade). As amostras da macrofauna serão lavadas em campo em malha de 0,5 mm, acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e fixadas em solução de formalina a 10%. Já as amostras de meiofauna serão diretamente acondicionadas em frascos plásticos em solução de formalina a 10%. Dados de salinidade e temperatura da água do mar serão registrados em campo com multiparâmetro (equipamento mais indicado para tais medições).

6.3.2 Análise das amostras e tratamento dos dados

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. Grupos como Mollusca, Polychaeta, Decapoda, Amphipoda, Isopoda, Tanaidacea e Echinodermatas serão enviados a especialistas para identificação. As amostras de meiofauna serão lavadas em peneira de 0,063mm. A meiofauna será extraída através de uma solução açucarada com gravidade específica de 1,14 e serão montadas lâminas semipermanentes, onde os organismos serão quantificados e identificados em grandes grupos e a nematofauna será identificada até a categoria de gênero, sob microscópio óptico.

Como descritores univariados da fauna serão utilizados os valores de riqueza (número de espécies), diversidade de Shannon-Wiener ($H' \log_2$) e densidade dos organismos mais abundantes. Para testar a significância dos descritores univariados da fauna serão aplicadas análises de variância (ANOVA). Para as estatísticas multivariadas serão utilizadas análises de ordenação (MDS), de variância permutacional (PERMANOVA) e de classificação (SIMPER) como proposto por Clarke & Ainsworth (1993), Clarke & Warwick (2001) e Anderson et al. (2008). Para a realização das análises estatísticas serão utilizados os aplicativos STATISTICA®, PRIMER®.

6.4 Monitoramento da qualidade química das areias

A praia é constituída 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. Na berma ocorre a maior parte da utilização das praias para fins de lazer por parte da população, e é, geralmente, escolhida como área de desova das tartarugas marinhas. Sendo assim, monitorar a presença de contaminantes químicos na areia das praias torna-se bastante relevante. Desta forma, o objetivo deste procedimento será avaliar a presença de elementos traço por espectrometria atômica na areia das praias e avaliar o impacto causado a este local após o acidente. A coleta será realizada conjuntamente ao estudo de morfologia e sedimentologia. Associado ao estudo de elementos traço, visando compreender se a presença dos mesmos é causada por fontes naturais ou antrópicas, será realizada a caracterização química e mineralógica.

6.4.1 Pré-Tratamento das amostras

No laboratório as amostras serão secadas a 60 °C, moídas, homogeneizadas adequadamente e peneiradas para obtenção de uma fração representativa para posterior análise química.

Fração Biodisponível: Para extração da fração biodisponível será utilizada a norma ASTM D3974-15 (ASTM, 2015), para a qual uma massa de amostra seca é pesada e transferida para um recipiente de polipropileno, onde são adicionados 100 mL de HCl 2,5% m/v. O sistema será submetido ao

agitador mecânico por 16 h a temperatura controlada de 25°C. O extrato obtido após filtração será analisado por ICP OES.

Fração Total: O procedimento de decomposição das amostras será adaptado a partir da norma EPA SW-846-3051 (U.S. EPA, 2007). Esta metodologia preconiza a digestão pseudototal de amostras de solos e sedimentos utilizando radiação micro-ondas para aquecimento e diferentes combinações de reagentes. Será utilizada uma massa de aproximadamente 0,25 g de amostra. Após a decomposição das amostras, as soluções amostrais serão filtradas e avolumadas a 25,00 mL. Essas soluções serão armazenadas em local adequado para posterior determinação dos elementos traço por espectrometria atômica.

6.4.2 Análise das amostras e tratamento dos dados

A determinação dos metais será realizada em ICP OES, modelo Optima 7000DV (PerkinElmer, USA), ICP-MS Nexlon 300D (PerkinElmer, USA) e AAS (Analytik Jena, Alemanha), utilizando as condições operacionais estabelecidas por Sousa (2015).

A caracterização química e mineralógica dos sedimentos será realizada por Difração de Raios-X, Fluorescência de Raios-X e/ou Microscopia de eletrônica de varredura acoplada a espectroscopia de energia dispersiva.

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 e Matlab MINITAB, versão 16 (JURADO, 2005; WOLD, 1987).

As análises e interpretação serão realizadas a partir da integração dos dados de morfodinâmica da praia, sedimentologia das areias, geoquímica dos sedimentos e composição bentônica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADDAD JE. Minerais pesados: uma ferramenta para prospecção, proveniência, paleogeografia e análise ambiental. 2001.
- ANDERSON, M., GORLEY, R., CLARKE, K. PERMANOVA. For PRIMER: Guide to software and statistical methods Plymouth. United Kingdom: PRIMER-E Ltd, 2008.
- ASTM. Standard Practices for Extraction of Trace Elements from Sediments. D3974 - 09(2015). Philadelphia: American Society of Testing and Materials (ASTM).
- BLOTT, S.J.; PYE, K. GRADISTAT: A grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. Earth Surface Processes and Landforms, 2001.
- CLARKE, K. R., AINSWORTH, M. A Method of Linking multivariate community structure to environmental variables. Marine Ecology Progress Series, 92, 205-219, 1993.
- CLARKE, K. B., WARWICK, R. M. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd Edition. PRIMER-E, Plymouth, 2001.
- DIAS, J. Alveirinho. A análise sedimentar e o conhecimentos dos sistemas marinhos. Portugal: Universidade do Algarve, 2004.
- FOLK, R. L.; WARD, W. C. 1957. Brazos River bar: a study in the significance of grain size parameters. Journal Of Sedimentary Research. 1957.
- JURADO, J. M.; ALCÁZAR, A.; PABLOS, F.; MARTÍN, M. J.; CONZÁLEZ, A. G.; Classification of aniseed drinks by means of cluster, linear discriminant analysis and soft independent modelling of class analogy based on their Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na and Si content. Talanta 66 (2005) 1350-1354.
- KNOX, G.A. The Ecology of Seashores. CRC Press: New York, 555 pp, 2000.
- MCLACHLAN, A.; BROWN, A.C. The Ecology of Sandy Shores, 2nd Edition, Acad. Press, New York, 373 pp, 2006.
- McLACHLAN. Sandy beach ecology – a review. In. McLachlan A e Erasmus, T. (eds.). Sandy beaches as ecosystems, Junk, Den Hague, 321-380, 1983.
- MUEHE, D.; ROSO, R.; SAVI, D.C. Avaliação de método expedito de determinação do nível do mar como datum vertical para amarração de perfis de praia. Revista Brasileira de Geomorfologia, Goiânia, v. 4, n.1, p. 53-57, 2003.
- MUEHE, D.. Método de levantamento topo-batimétrico do sistema praia-antepraia. Revista Brasileira de Geomorfologia, Uberlândia, v. 5, n.1, p. 95-100, 2004
- 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coastaleng.2012.03.003>>.

- SALLENGER, A. H. J.; 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, p. 279–297, 2002.
- SHORT, A. D.; WRIGHT, L. D. Physical variability of sandy beaches. In: MCLACHLAN, A.; ERASMUS, T. (Eds.) *Sandy Beaches as Ecosystems*. Junk, The Hague: 133-144. 1983.
- SOUSA, R. M. Avaliação da Contaminação das Areias de Praia do Litoral do Espírito Santo por Elementos-traço. Dissertação de Mestrado, 2015.
- 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.
- TOLMAN, H. L., 2009: User manual and system documentation of WAVEWATCH III version 3.14. NOAA / NWS / NCEP / MMAB Technical Note 276, 194 pp.+ Appendices.2009)
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. **Method 3051a: MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS**. United States, 2007
- WOLD, S.; Principal Componente Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2 (1987) 37–52.

**ALTERAÇÕES ECOLÓGICAS NA DINÂMICA DOS MANGUEZAIS E VEGETAÇÃO DE
RESTINGA SOB INFLUÊNCIA DOS SEDIMENTOS PROVENIENTES DO RIO DOCE
(ANEXO 5)**

SUB-PROJETO: MANGUEZAL

1. EQUIPÉTICA

Nome	Função	Instituição
Mônica Maria Pereira Tognella	Coordenação Geral	UFES
Antelmo Ralf Falqueto	Sub coordenação Fisiologia Vegetal	UFES
Adriano Alves Fernandes	Cultivo ex situ e nutrição vegetal <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>	UFES
Anders Schmidt	Dinâmica da Fauna Monitoramento Caravelas	UFESB
Andreia Barcellos Passos Lima Gontijo	Cultivo <i>ex situ</i> e análise de metais vegetação	UFES
Filipe Chaves	Estrutura de Florestas Monitoramento Caravelas	UERJ
Helia Del Carmen Espinoza Farias	Cartografia e Mapeamento de habitats	UNIVALI
Ivoney Gontijo	Mapeamento sedimentos Intertidal Foz do Rio Doce Análise dos sedimentos	UFES
Marcelo Barcellos da Rosa	Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o metabolismo primário das florestas de manguezal	UFESM
Mário Luis Gomes Soares	Dinâmica das Florestas Monitoramento Caravelas	UERJ
Simone Rabelo Cunha	Análises Estatísticas	UFPE
Vander Calmon Tosta	Análises Estatísticas e Fauna	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UERJ
Profissional Júnior	Pesquisador	UERJ
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Técnico de Nível Médio	Pesquisador	UFES
Técnico de Nível Médio	Pesquisador	UFESB
Técnico de Nível Médio	Pesquisador	UNIVALI
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES

Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ
Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ
Iniciação Científica	Pesquisador	UFPE
Iniciação Científica	Pesquisador	UFSB

2. ESCOPO

Este anexo envolve o monitoramento e avaliação dos manguezais distribuídos ao longo da costa norte do litoral capixaba até o litoral sul da Bahia. Como pontos focais foram selecionadas as seguintes áreas de estudo: Estuário do Rio Piraquê, bosques de franja nos arrecifes e Estuário do Rio Riacho (Aracruz); Foz do Rio Doce e Estuário do Rio Uruçuquara (Linhares); Estuário do Rio Mariricu (Barra Nova) e Estuário do São Mateus (São Mateus e Conceição da Barra); e Estuário do Rio Caravelas (Caravelas - BA). Além dos aspectos de monitoramento ambiental envolvendo as florestas de manguezal nas áreas, serão realizados estudos de análise da dinâmica estuarina para avaliação do processo de dispersão dos contaminantes (se houver) e dos propágulos de áreas fontes por ventura contaminadas. Esta caracterização que irá envolver análise da entrada de ondas nos estuários e vazão dos rios permitirá modelar a estratigrafia do estuário em relação a salinidade que por sua vez contribui para o entendimento da dispersão dos contaminantes nas áreas de estudo.

Esforços serão concentrados na análise da produção primária das florestas e na avaliação da presença/concentração de metais nos compartimentos vegetais e no sedimento. Subsequente, cultivos *ex situ* serão realizados inicialmente com o contaminante Fe para diagnóstico da concentração tóxica e avaliação de alterações morfológicas e fisiológicas que possam ocorrer.

Em relação a fauna, haverá concentração sobre as espécies chave no ecossistema manguezal e que são de importância econômica ou que se encontrem em risco de extinção. Os caranguejos *U. cordatus* e *C. guahumii* terão suas populações avaliadas e monitoradas nos pontos focais. *U. cordatus*, por sua importância econômica para as comunidades tradicionais, terá sua fertilidade monitorada.

3. OBJETIVO

Avaliar as áreas de manguezal no litoral norte capixaba e extremo sul da Bahia 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

As coordenadas especificadas na TR são pontos com as coordenadas geográficas de latitude e longitude aproximadas da região da foz dos seguintes rios: Rios Piraquê-Açu e Mirim (377123.22 m E, 7793841.94 m S), Rio Urussuquara (424260.44 m E, 7888200.89 m S), Rio Mariricu (422327.64 m E, 7904144.61 m S) e Rio São Mateus (422676.94 m E, 7943585.45 m S), Caravelas (422676.94 m E, 7943585.45 m S).

Meta 1- Impactos na flora do Rio Doce

- 1.1. Estrutura da vegetação halófitas na planície lamosa do estuário do Rio Doce.
- 1.2. Determinação da produção primária por meio de técnica de assimilação de carbono. Estimativa dos dados de fotossíntese, da concentração dos pigmentos fotossintéticos, da respiração e de uso efetivo da água.

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- Estrutura e Funcionamento dos Manguezais de São Mateus, Mariricu (Barra Nova e Nativo), Barra Seca (Urussuquara), Aracruz (Barra do Riacho, Santa Cruz e Piraquê-Açú, Mirim) e Caravelas.

- 2.1. Estrutura da Floresta nas porções baixo, médio e alto estuário com estabelecimento de parcelas fixas nos bosques de franja e bacia.
- 2.2. Aquisição de dados de produção primária (fotossíntese, fluorescência, pigmentos).
- 2.3. Amostragem de material para coleta de contaminantes.

Justificativa da Meta 2: 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. Os pontos focais selecionados são estuários que estiveram sob influência da pluma de sedimentos que se dispersou e se depositou ao longo destes litorais. O monitoramento em longo prazo se faz necessário, uma vez que este material poderá ser fonte constante de contaminação.

Meta 3- Diagnóstico sobre a fauna do manguezal, compartimento caranguejos.

3.1. Avaliação da estrutura populacional dos decápodes da espécie *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos Rios Piraquê (Açú e Mirin), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz.

3.2. Mapeamento dos habitats das espécies de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos Rios Piraquê (Açú e Mirin), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz.

Justificativa da Meta 3: 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. guahumii*. 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 em extinção no litoral capixaba o que torna mais significativo seu monitoramento, uma vez que sua captura foi proibida visando a conservação destas populações. Existem vários estudos que comprovam 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 por isto está sendo realizado o acompanhamento da fertilidade. 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 4- Diagnóstico de contaminação da vegetação do manguezal por metais nas áreas de estudo.

4.1. Experimentos *insitu*.

4.2. Experimentos *in situ* de Variabilidade Espacial.

4.3. Experimentos *ex situ*.

4.4 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 4: Esta etapa juntamente com a etapa 2 e a etapa 5 vão contribuir para o diagnóstico da contaminação das florestas de manguezais nos pontos focais. Com os dados da etapa 2 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. A meta 5 permitirá, juntamente com o monitoramento da contaminação da área costeira, dispersão e depósito dos contaminantes estabelecer onexo causal do dano, uma vez que não existem dados pretéritos, salvo raríssimas situações, nos pontos focais que comprovem a contaminação. Por outro lado, salvo melhor juízo, não houve obtenção destes dados uma vez que se comprovou a dispersão da pluma de sedimentos para estas regiões.

Meta 5- Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê.

5.1. Caracterização da cunha salina nas áreas de estudo com monitoramento em ciclo de maré no alto e baixo estuário.

Justificativa da Meta 5: Etapa extremamente importante uma vez que contribuirá para entender os padrões de inundação dos estuários e conseqüentemente realizar um macrodiagnóstico da probabilidade de dispersão dos contaminantes em cada sistema. Este estudo associado aos demais realizados na zona costeira vai contribuir para determinar potencialidade de contaminação ou não dos estuários. Seu monitoramento em longo prazo trará maiores contribuições para o entendimento dos processos de contaminação e tempo de resiliência dos sedimentos e contaminantes na região costeira estuarina.

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>
Meta 1 - 3 parcelas fixas realizadas - Coletas de dados trimestrais de fluorescência e fotossíntese - Coleta, processamento e análises semi dados - Analise dos dados de produção primária	Mônica Tognella Antelmo Falqueto
Meta 2 - 3 a 12 parcelas fixas por ponto focal realizadas no litoral capixaba - Coleta e análise de dados bimensais de fluorescência e fotossíntese no litoral capixaba - Coleta e análises semestrais de pigmentos - Coleta e processamento de amostras semestrais de folhas para análise de metais - Coleta e processamento de sedimentos semestrais para análise de metais e granulometria - Planejamento estatístico para coleta de dados e interpretação dos resultados - 12 parcelas fixas em Caravelas. - Coleta semestrais de folhas e sedimentos em Caravelas para análise de metais. - Análise dos dados de estrutura Caravelas e litoral capixaba. - Processamento das amostras de metais em material vegetal. - Processamento das amostras de metais no sedimento - Coleta de dados bimensais de fluorescência, pigmentos e fotossíntese em Caravelas.	Mônica Tognella Antelmo Falqueto Adriano Alves Ivoney Gontijo Filipe Chaves Mário Soares Maria Teresa* Renato Neto*

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Meta 1 - Análise espaço-temporal da produção primária na vegetação halófitas do Rio Doce. - Discussão dos dados de produção primária considerando sua integração a variabilidade espacial dos sedimentos e metais na foz do Rio Doce. - Discussão dos dados de produção primária considerando a dinâmica do estuário na foz do Rio Doce.	Antelmo Ralf Falqueto, Andreia Gontijo Mônica Tognella. Ivoney Gontijo, Adriano Alves Valéria Quaresma* Renato Neto.
Meta 2 - Análise espacial da estrutura das florestas de manguezal nos estuários. - Análise espaço-temporal dos dados de produção primária nos pontos focais. - Análise espaço-temporal dos dados de metais no sedimento e na vegetação. - Correlação entre a distribuição espacial da estrutura espaço-temporal da produção primária e dos metais com os dados de dinâmica nos estuários.	Mônica Tognella Mário Soares Filipe Chaves. Antelmo Falqueto Simone Cunha. Adriano Alves Ivoney Gontijo Andreia Gontijo. Valéria Quaresma*

<p>Meta 3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Análise espaço-temporal da estrutura dos caranguejos <i>U. cordatus</i> e <i>C. guahumii</i>. - Análise da fertilidade de <i>U. cordatus</i>. - Mapeamento dos habitats para <i>U. cordatus</i> nas áreas de estudo do litoral capixaba de acordo com imagens disponíveis. - Mapeamento dos habitats para <i>C. guahumii</i> nas áreas de estudo do litoral capixaba de acordo com imagens disponíveis. 	<p>Anders Schmidt Vander Tosta Mônica Tognella. Helia Farias</p>
<p>Meta 4</p> <ul style="list-style-type: none"> - Análise da toxicidade do Fe para a espécie <i>R. mangle</i> em cultivos <i>ex situ</i>. - Determinação da taxa de mortalidade nos experimentos e taxa decrescimento. - 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 na produção primária. - Análise da atividade antioxidante e radicular e sua correlação com os contaminantes. - Correlação entre os efeitos tóxicos obtidos nos experimentos e os dados coletados em campo. 	<p>Andreia Gontijo Adriano Alves Antelmo Falqueto Mônica Tognella. Mário Soares Marcelo da Rosa Simone Rabelo Ivoney Gontijo</p>
<p>Meta 5</p> <ul style="list-style-type: none"> - Avaliação do comportamento hidrodinâmico dos estuários estudados. - Correlação entre ciclo de maré e contaminantes na coluna d'água. - Correlação entre ciclo de maré e contaminantes nas florestas de manguezal. 	<p>Daniel Rigo* Renato Neto Valéria Quaresma Mônica Tognella. Andreia Gontijo Adriano Alves Antelmo Falqueto Mário Soares Marcelo da Rosa Simone Rabelo Ivoney Gontijo</p>

*Professores integrantes do projeto geral, mas listados em equipes técnicas de outros sub-projetos.
Os dados produzidos serão ainda comparados e analisados com dados pretéritos existentes

6. METODOLOGIA

6.1 - Impactos na flora do Rio Doce.

A - Monitorar a fitossociologia da vegetação paludal na foz do Rio Doce.

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

Nesta meta serão realizadas saídas de campo para estimar a fitossociologia da vegetação paludal e halófitas facultativas que vão compor a comunidade vegetal nas margens situadas na foz do Rio Doce.

Para isto serão realizadas cinco parcelas fixas, com dimensões variáveis de acordo com a estrutura da vegetação. Estas parcelas terão sua delimitação definida geograficamente com emprego de RTK (Trimble R4Base) que permite a obtenção de dados de latitude e longitude em tempo real e precisão de milímetros.

Dados da estrutura da comunidade serão obtidos como: diâmetro e altura das árvores e arbusto. Para isto serão empregados trenas calibradas em $\square\square$ e telêmetro (Tognella De Rosa, 2000). Dados de biomassa quando possível, isto é, vegetação herbácea será coletada em áreas pré-definidas e levadas ao laboratório para tomada de peso seco, por espécie (Cunha *et al.* 2006). Cada espécie de porte arbóreo será marcada

com lacre numerado para que as parcelas fixas sejam monitoradas anualmente ao longo de um período de cinco anos.

Os dados obtidos em campo serão analisados de acordo com os parâmetros da população para avaliação da densidade, composição, biomassa, abundância e índice de importância da espécie em cada parcela. Estes parâmetros serão acompanhados nas avaliações anuais e tratados estatisticamente, de acordo com análises não paramétricas, para avaliar comparar se estão acontecendo modificações significativas na estrutura da comunidade (Zar, 1998).

Para efeitos de diagnóstico dos impactos que possam ser oriundos dos sedimentos depositados e de origem do dano provocado pelo rompimento da represa de contenção de dejetos da mineração, há necessidade de coletas de sedimentos em cada parcela, anualmente, para que sejam avaliados o grau de contaminação de metais, análise granulométrica, teor de matéria orgânica entre outros parâmetros. A metodologia de coleta e de análise dos parâmetros definidos anteriormente serão descritas nos projetos relativos as linhas de pesquisa de sedimentologia e de geoquímica (buscando a padronização das coletas com os demais anexos para que os dados tenham os mesmos procedimentos metodológicos)

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

Na comunidade vegetal de *Talipariti pernambucensis* (Arruda (Bovini 2010)) serão obtidos parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em folhas de 2º par das espécies de porte arbóreo dentro das parcelas fixas, sendo selecionados 3 indivíduos por espécie. Estas folhas serão selecionadas dentro daquelas avaliadas como intactas e completamente expandidas (n = 6). A fluorescência será obtida utilizando o fluorômetro portátil Hand-PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK) e trocas gasosas empregando o sistema portátil ADC, modelo LCi (ADC, Bio Scientific Ltd. Hoddesdon, England), mais detalhes a respeito dos parâmetros e técnicas utilizadas encontram-se descritos em Pascoalini (2014).

Em visitas prévias a esta área de estudo, tendo em vista os fragmentos da vegetação e algumas distribuições pontuais, assumimos que o quantitativo de cinco parcelas definidas na TR seriam excessiva e, por isso, remanejamos o número de parcelas para 3 parcelas permanentes. Na vistoria definitiva se a equipe entender que se faz necessário a inclusão de mais áreas isto será realizado sem ônus para o planejamento amostral.

As folhas serão coletadas para análise posterior de pigmentos fotossintéticos, compondo uma amostra para as três parcelas. Além dos pigmentos serão avaliados em campo os aspectos morfológicos das folhas com obtenção *in situ* de dados de área foliar (comprimento e largura) bem como o índice de cobertura vegetal. Para isto será necessário a obtenção de um avaliador digital de área foliar e um equipamento digital para dimensionar o índice de cobertura foliar. Estes parâmetros monitorados em longo prazo vão contribuir para entendimento das alterações fisiológicas induzidas pelos contaminantes.

Os dados de campo serão coletados pelos técnicos em estrutura, fotossíntese e fluorescência, bem como, respectivos bolsistas.

O monitoramento dos parâmetros que vão identificar a produção primária da vegetação e que podem indicar tensões sobre o desenvolvimento da comunidade serão obtidos nas estações de seca e de chuva ao longo de cinco anos. Estes dados serão analisados empregando-se técnicas de estatística básica (média, desvio padrão), análises paramétricas (ANOVA e teste de Student) para comparação da variabilidade dos resultados e das médias obtidas por amostra e análises não paramétricas (Kruskal Wallis, ACP) quando necessária e de acordo com o tipo de parâmetro coletado (Zar, 1998). Sempre que necessário, os dados obtidos em campo serão normalizados (Gotelli e Ellison, 2012).

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

Parte destes dados já estão sendo obtidos para o rio São Mateus com o desenvolvimento da tese de doutorado de Dielle Santana, sendo a metodologia já descrita no projeto de tese.

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

O acompanhamento desta etapa consiste na avaliação da pressão que possa ocorrer sobre esta comunidade vegetal em decorrência dos sedimentos contaminados, do grau de contaminação (tipo e

concentração), da frequência e intensidade dos distúrbios. A avaliação em longo prazo da produção primária da comunidade vegetal permitirá eliminar o efeito ambiental sobre a variabilidade de produção e aferir o comprometimento causado pelos contaminantes. Para melhor qualificar esta etapa, procedimentos similares de análise de produtividade primária serão desenvolvidos na comunidade de *Talipariti pernambucensis* que ocorre no Rio Itaúnas para efeitos de controle e eliminação da variabilidade resultante das influências climáticas.

6.2. Estrutura e Funcionamento dos Manguezais de São Mateus, Mariricu (Barra Nova e Nativo), Barra Seca (Urussuquara), Aracruz (Barra do Riacho, Santa Cruz e Piraquê-Açú, Mirim) e Caravelas. Acompanhamento de dados pretéritos.

A estrutura da vegetação será realizada seguindo metodologia proposta por Schaeffer-Novelli e Cintrón (1986), sendo adotado o método de parcelas (com 3 réplicas por área) cujo tamanho varia conforme o número de indivíduos, isto é, será considerado um mínimo de 30. Os parâmetros coletados serão a altura e o diâmetro na altura do peito (DAP) ou igual 1,30 m. Em laboratório, serão calculados os parâmetros de área basal, diâmetro e altura média e densidade e dominância relativa das espécies no bosque. Estes dados de estrutura quando acompanhados em longo prazo permite identificar alterações na dinâmica populacional. Desta forma, serão avaliadas florestas de franja e de bacia e dentro de cada parcela cinco árvores, caracterizando a distribuição de frequência dos diâmetros de todas as árvores que ocorrem na amostra, terão seu incremento em diâmetro monitorados pela utilização de dendrômetros.

Da mesma forma que no item de levantamento da vegetação da foz do Rio Doce, esta etapa consiste na avaliação e acompanhamento da estrutura dos manguezais que se encontram sob influência indireta dos sedimentos provenientes da represa de contenção da Samarco.

As parcelas fixas serão realizadas em locais onde já existem dados pretéritos de análise da estrutura das florestas de mangue nos Rios São Mateus, Mariricu, Corrego de Barra Nova, Urussuquara, Barra do Riacho, Santa Cruz, Piraquê-Açú e Piraquê-Mirin e em Caravelas (BA). Esta última localidade será de responsabilidade da equipe de especialistas da UERJ que já possuem dados pretéritos na região. A delimitação das parcelas vai contribuir para o entendimento dos processos de inundação, permitindo avaliar o potencial impacto dos sedimentos sobre as florestas de manguezal caracterizadas como de franja e de bacia (Schaeffer-Novelli *et al.* 2000).

Em cada rio serão instaladas parcelas na foz, na parte intermediária do estuário e na porção superior do mesmo. Desta forma, serão 3 regiões amostrais com parcelas definidas para as florestas de franja e bacia, totalizando 12 parcelas por rio. O número de parcelas será distinto para as áreas de Mariricu (9), Urussuquara (3), Barra do Riacho (6) e Santa Cruz (6). Já existem dados coletados sobre a estrutura dos manguezais no rio São Mateus, diferentes bosques e regiões, bem como parcelas pontuais estabelecidas no Rio Mariricu e Corrego Barra Seca. Além de parcelas estabelecidas nos Rios Piraquê-Açú e Mirin. O número de parcelas por área decorre da extensão dos manguezais nos diferentes estuários, considerando sempre que cada região escolhida terá triplicatas.

Cada parcela será georeferenciada com emprego de RTK, Marca Trimble modelo R4Base, que tem precisão de 3,5 mm de erro horizontal. Permitindo com isto controle inclusive sobre o ingresso de novos indivíduos em longo prazo. Quando não adequado o emprego do RTK, será utilizado GPS de mão sem maior precisão de coleta de dados.

Estas parcelas serão monitoradas anualmente para avaliar a qualidade do bosque e nestas oportunidades serão quantificados no número de plântulas que ingressou na parcela. Esta avaliação é importante para determinação da taxa de crescimento do bosque, para estimativa de manutenção da composição de indivíduos adultos. Nestas ocasiões serão monitorados os dendrômetros instalados nas árvores.

A etapa de estrutura em Caravelas será realizada pelos técnicos contratados para este fim, sob a responsabilidade dos Drs. Mário Soares e Filipe Chaves, ambos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, uma vez que os mesmos já possuem dados pretéritos da região.

6.2.2 Aquisição de dados de produção primária (fotossíntese, fluorescência, pigmentos).

Serão obtidos parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em folhas de 2° par das espécies de porte arbóreo dentro das parcelas fixas, sendo selecionados 10 indivíduos por espécie. Estas folhas serão selecionadas dentro daquelas avaliadas como intactas e completamente expandidas (n=6). A fluorescência será obtida utilizando o fluorômetro portátil Hand-PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK) e trocas gasosas empregando o sistema portátil ADC, modelo LCi (ADC, Bio Scientific Ltd. Hoddesdon, England), mais detalhes a respeito dos parâmetros e técnicas utilizadas encontram-se descritos em Pascoalini (2014). As folhas serão coletadas para análise posterior de pigmentos fotossintéticos.

O monitoramento dos parâmetros que vão identificar a produção primária da vegetação e que podem indicar tensores sobre o desenvolvimento da comunidade serão obtidos nas estações de seca e de chuva ao longo de cinco anos. Estes dados serão analisados empregando-se técnicas de estatística básica (média, desvio padrão), análises paramétricas (ANOVA e teste de Student) para comparação da variabilidade dos resultados e das médias obtidas por amostra, e análises não paramétricas (Kruskal Wallis, ACP) quando necessária e de acordo com o tipo de parâmetro coletado (Zar, 1998). Sempre que necessário, os dados obtidos em campo serão normalizados (Gotelli e Ellison, 2012).

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

Em campo serão obtidos dados de área foliar (várias amostras e locais por área) e do índice de área foliar para acompanhamento das variações que podem vir a ocorrer em situação de contaminação crônica. Quando possível será utilizado o RTK para posicionamento geográfico da amostra, não havendo condições de transmissão de sinal por adensamento de copa será utilizado GPS que apesar de ter menor precisão, não perde o sinal quando ocorrem obstáculos como o RTK mais sensível aos acidentes geográficos para equiparação de dados em temporeal.

Esta etapa será desenvolvida pelos técnicos de fotossíntese, fluorescência e pigmentos, bem como os demais bolsistas envolvidos. As parcelas serão monitoradas anualmente.

6.2.3. Amostragem de material para coleta de contaminantes.

As amostras serão coletadas aleatoriamente para compor uma amostra composta por estuário. Este item será descrito na meta 4.

6.3. Diagnóstico sobre a fauna do manguezal, compartimento caranguejos.

6.3.1. Avaliar da estrutura populacional dos decápodes da espécie *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos Rios Piraquê (Açú e Mirin), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz.

Delimitação de 12 parcelas fixas contendo 25 m², delimitadas com trena de 50 m e marcadas nos seus extremos com lacres, georeferenciadas e fotografadas. As parcelas serão situadas no estuário inferior, médio e superior para bosques de franja e bacia localizadas contíguas as parcelas fixas para que não haja interferência entre os dois estudos por excesso de manipulação da área amostral.

Nas parcelas serão realizadas as seguintes atividades em frequência bimensal: contagem das tocas diferenciando-as em abertas, fechadas (mortas e em muda), comprimento e largura das tocas e densidade de machos e fêmeas. A metodologia de amostragem baseia-se em Branco (1993). Os dados serão trabalhados em laboratório para produzir os seguintes resultados: densidade por metro quadrado da espécie, tamanho médio da população, proporção entre machos e fêmeas, densidade de indivíduos mortos.

Na área da RVS de Santa Cruz serão realizadas coletas aleatórias para levantamento dos crustáceos decapodas associados as franjas de manguezal. As espécies serão identificadas e terão sua abundância avaliada sempre que possível. Alguns exemplares serão encaminhados para a equipe responsável pela ecotoxicologia. Os procedimentos para as espécies de interesse econômico *U. cordatus* e *C. guahumii* serão similares as demais áreas com demarcação de parcelas. As amostragens vão ocorrer nas comunidades de manguezal para não haver sobreposição com as coletas de organismos no inframaré realizado por outros anexos.

Duas vezes ao ano (inverno e verão) serão coletados aleatoriamente ao longo dos estuários 100 exemplares de caranguejos para aferição da estrutura da população e para que estes dados sejam comparados com os dados de estrutura obtidos por técnica indireta de avaliação, reportada acima. A técnica empregada nesta etapa será de captura e solta. Estes exemplares serão coletados por catadores profissionais e terão seu comprimento e largura aferidos por meio de paquímetro digital. Cada exemplar terá seu sexo e condição de vida anotado para determinação da razão sexual e para avaliação do período de reprodução. A metodologia aplicada nesta etapa está sendo desenvolvida na dissertação de mestrado de Vanessa Spinasse, sob orientação desta coordenação e realizada nos Rios Piraquê-Açú e Mirin.

Nos rios Piraquê-Açú e Piraquê-Mirin terão suas parcelas definidas em áreas onde já ocorrem levantamentos sobre a estrutura da população de *Ucides cordatus*. Conseqüentemente, serão utilizados estes dados pretéritos para diagnóstico do impacto atual sobre a estrutura da população da espécie nesta bacia hidrográfica. Em relação ao rio São Mateus já existem dados coletados continuamente desde 2012

por ocasião do trabalho de conclusão de curso de Jormara Affonso Mesquita e que foram continuados e ampliados com a orientação de iniciação científica de Laís Altoé Porto, ambas sob nossa orientação. Anualmente, 10 fêmeas ovadas de *Ucides cordatus* e de *Cardisoma guahumii* serão capturadas aleatoriamente nas parcelas para que seja realizado a contagem do número de ovos. Estas fêmeas serão transportadas para o laboratório onde os ovos serão retirados dos pleiópodos para determinação da densidade empregando-se lupa estereoscópica e câmara clara. Esta metodologia está sendo desenvolvida no trabalho de conclusão de curso de Laís Altoé Porto no rio São Mateus.

Após estas análises preliminares será realizado tratamento estatístico empregando-se o programa Statistica (StaSoft) para avaliar os dados médios obtidos, diferenciados quanto aos parâmetros obtidos para fêmeas e machos por parcela, por bosque e por área de distribuição no estuário. Estas médias serão comparadas aplicando-se Teste de Tukey e realizaremos análise de cluster para avaliar o grau de similaridade entre os bosques e em relação a sua distribuição no estuário (Zar, 1998).

Durante as campanhas será necessário a contratação de pessoal capacitado para realizar a captura dos caranguejos para avaliação do tamanho e para a coleta de fêmeas ovadas.

Em relação as amostragens para avaliação da espécie *Cardisoma guahumii* será utilizadas 10 armadilhas, tipo ratoeira, posicionada na toca e o animal apreendido terá seu tamanho de carapaça e sexo aferido. Esta etapa será executada por catador de caranguejo e acompanhada por técnico de fauna. Serão realizadas duas campanhas anuais por área de estudo.

Será necessário a contratação de análises de toxicologia para determinação da contaminação das populações de *U. cordatus*.

A etapa deste item desenvolvida em Caravelas contará com a coordenação do pesquisador Anders lotado na Universidade Federal do Sul da Bahia com auxílio de um técnico e de um bolsista. O pesquisador irá colaborar na análise dos dados das demais áreas.

6.3.2. Mapeamento dos habitats das espécies de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos Rios Piraquê (Açu e Mirim), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de SantaCruz.

Esta etapa metodológica está sendo proposta para atender o componente da TR que trata especificamente da distribuição e extensão dos habitats das duas espécies alvo. As comunidades locais que vivem próximas aos manguezais e dependem dos recursos oriundos deste ecossistema desenvolveram um amplo conhecimento dos componentes bióticos e abióticos que o integram (Alves e Nishida, 2002).

Por outra parte os impactos causados na zona costeira sempre despertaram o interesse dos pesquisadores, principalmente quando são desenvolvidas em áreas ecologicamente frágeis. Nesse contexto, a análise que pretende ser apresentada neste trabalho integra informações obtidas através de imagens de resolução média e de alta resolução de sensoriamento remoto numa perspectiva multitemporal, diagnosticando os padrões de uso e ocupação, avaliando os principais impactos da área, juntamente com a fisiografia da região. A utilização de imagens de alta resolução permitirá a geração de uma cartografia mais precisa com ajuda da comunidade local, facilitando a quantificação da evolução da paisagem e consequentemente a tomada de decisões.

O sensoriamento remoto e as diferentes técnicas de Geoprocessamento têm sido extensivamente empregados como ferramentas auxiliares na caracterização e monitoramento da variabilidade de ambientes terrestres, como consequência de sua ampla capacidade de cobertura geográfica, análise sinóptica e alto poder de resolução espacial (Pinheiro *et al*, 2007).

Cada parcela terá quatro (4) coordenadas geográficas no mínimo obtidas através de um GPS Trimble de pós-processamento. Com essas coordenadas, estimamos a distância entre parcelas e a distância das parcelas ao ponto mais próximo geodésico (levantamento preciso por RTK).

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) geo-referenciados e corrigidas geometricamente pelo algoritmo de interpolação de filtragem convolução cúbica (ortoretificada e georreferenciada), pela própria empresa que fornece (ao total 40 imagens em 5 anos). Para verificar a precisão desse georreferenciamento, uma base de contornos vetoriais de área de estudo no formato shapefile (*.shp) vai ser sobreposta a uma das bandas adquiridas. Vão ser gerados arquivos shapefile a partir da utilização de GPS pós-processado da Trimble, por caminhamento (linhas, pontos e áreas).

Vai ser utilizado a seguir o Sistema de Informações Geográficas SPRING® (INPE) 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 vai ser realizada a segmentação da imagem, empregando-se os algoritmos de classificação por regiões. Depois de avaliar os resultados, se iniciará o processo de classificação supervisionada por pixel, para efeito comparativo.

Os arquivos resultantes das etapas de processamento vão ser 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 vai ser realizado no SIG ArcGIS® (ESRI).

O Banco de Dados Georreferenciado vai ser também implementado no SIG ArcGIS® (ESRI). A leitura das regiões será realizada por meio da grade de pontos de coleta amostrados durante o projeto (tabela de dados em formato MS Excel® convertida para um arquivo em formato shapefile).

A produção de mapas temáticos vai incorporar os dados tabulares de pontos amostrais e respectivos valores de parâmetros ambientais e densidade, juntamente com as imagens em formato GeoTIFF.

No primeiro ano serão realizadas 7 campanhas (três dias de duração) com repetição semestral em cada uma das áreas para determinação da posição geográfica em tempo real para a determinação do habitat das espécies avaliadas neste item. Para perfeito ajuste das coordenadas serão realizadas expedições em busca do nível geodésico de referência mais próximo, quando possível.

Quando não possível serão realizadas campanhas de 04 horas com a implantação da base e do rover do RTK para obtenção de dados precisos que serão ajustados por triangulação com as estações de referência mais próximas (Vitória, Viçosa e Teixeira de Freitas). Após estes cuidados serão realizadas as campanhas para determinação da distribuição do habitat das espécies.

Estes dados serão transferidos para o banco de dados e monitorados ao longo dos cinco anos para elaboração dos mapas temáticos anuais para cada uma das áreas. Para isto será necessário a aquisição de imagens de alta precisão já georreferenciadas para que sejam utilizadas de base e complementares as imagens de Landsat de distribuição gratuita.

Os resultados esperados são:

1. Quantificação da evolução da paisagem, unidades de paisagens serão identificadas e delineadas.
2. Definição de áreas de uso, áreas de conservação e áreas de preservação; parâmetros, estes, inseridos no conceito de Potencialidades.
3. Mudanças no estoque e distribuição da espécie.
4. Mapeamento temático preciso da localização e ocorrência das espécies das áreas de estudo ao longo dos anos.
5. Diagnóstico geoambiental, matrizes e mapas que auxiliarão de maneira racional, simples, rápida e barata o gerenciamento da fauna estudada.
6. As informações obtidas no decorrer da pesquisa vão ser armazenadas em um Banco de Dados Ambientais Georreferenciados, construído sob a ótica dos Sistemas de Informações Geográficas (SIG's), que facilitam sobremaneira a gestão ambiental, no sentido de as informações poderem ser acessadas de forma rápida e racional.

Esta etapa está sendo desenvolvida em parceria com a Universidade do Vale de Itajaí. Para as atividades em campo há necessidade de um técnico em cartografia e para as atividades em laboratório, realizadas em Itajaí, será necessário outro técnico e um bolsista ITI.

A equipe responsável pelo mapeamento fará a delimitação do habitat em campanhas semestrais com duração de 2 a 3 dias nas áreas de estudos localizadas no Espírito Santo. A primeira ocorrerá no início do processo de monitoramento produzindo dados prévios de localização das parcelas e de alguns pontos amostrais, dados estes que irão compor os mapas temáticos. Após esta campanha prévia, os integrantes da fauna e flora ficarão responsáveis, após treinamento, para a obtenção dos dados de posicionamento das parcelas nas saídas bimensais, alimentando o banco de dados. Nova campanha para realizar verdade de campo após 6 meses de execução do levantamento e servirão para o término dos mapas de distribuição dos habitats de *U. cordatus* e *C. guahumii*.

6.4. Diagnóstico de contaminação da vegetação do manguezal por metais nas áreas de estudo.

Material Vegetal e condições de Amostragem - será avaliada inicialmente a espécie *Rhizophora mangle* que já se detem o protocolo de cultivo hidropônico e mais abundante nos manguezais do estado do Espírito Santo. Para esta etapa será necessário a contratação de técnico para as análises de estresse oxidativos que serão executadas na Universidade Federal de Santa Maria. Os técnicos de sedimento,

cultivo, produção primária do cultivo e anatomia vão realizar as etapas descritas abaixo. Os responsáveis técnicos deste item também serão contemplados com bolsistas ITI.

Descrição dos Experimentos

1- Experimentos in situ: A coleta de amostras vegetais será feita em oito áreas de mangue potenciais de contaminação e os resultados obtidos serão confrontados com aqueles obtidos em área de manguezal não contaminada (Itaunas). As áreas serão divididas em 12 parcelas de 10 x 10m (100m²), sendo 6 parcelas em cada margem do rio. Serão coletadas 10 amostras em cada parcela. Estas amostras serão homogeneizadas para a retirada da amostra composta representativa de cada parcela. Como serão realizadas amostras de folhas e raízes de duas espécies e determinou-se 12 parcelas por área, teremos 48 amostras/parcela. Incluindo a área testemunhas serão 9 áreas x 48 amostras, totalizando 432 amostras/ano.

2- Experimentos in situ de Variabilidade Espacial: O experimento será conduzido em área de mangue no norte do Espírito Santo e sul da Bahia. Após monitoramento realizado no primeiro ano, no qual se verificará quais das 8 (oito) áreas de manguezal há teores de metais pesados acima do limite estabelecido como adequado. Será instalada em umas das áreas, uma malha quadrangular de 140x144m (20.160m²) com 100 pontos, com distância mínima de 5 m, em cada ponto amostral serão coletadas amostras de sedimentos e folhas de plantas da espécie *Rhizophoramangle*.

Em cada um dos 100 pontos de amostragem, serão coletadas uma amostra de sedimento e uma amostra foliar da planta indicadora. As amostras deverão ser coletadas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento. As amostras deverão ser fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento. 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. Serão coletadas quatro folhas recém maduras e completamente desenvolvidas, as mesmas serão levadas ao laboratório, onde serão lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e, logo após, em água corrente e água destilada. Em seguida as folhas serão secas em estufa de circulação forçada a 65°C até massa constante, moídas em moinho tipo Wiley, passadas em peneira de malha de 0,841mm e, então enviadas para análise. Em todas as amostras de sedimento e folhas serão analisados os seguintes metais: 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).

3- Experimentos ex situ: serão realizados em estufas agrícolas para o cultivo em hidroponia do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES – UFES, em São Mateus, Espírito Santo, latitude de 18°40'32"S, longitude de 80 39°51'39"W e altitude de 37,7m acima do mar. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é seco sub-úmido, com temperaturas variando de (25° a 30° no verão) e (19° a 21° no inverno) e precipitação média anual de 1400 e 1500mm.

Será cultivada a espécie *Rhizophora mangle* outra em função da ocorrência predominante na área e adaptação ao cultivo em hidroponia. Os experimentos serão em delineamento inteiramente casualizados com 05 tratamentos (doses crescentes dos metais) e mínimo de 4 repetições, sendo de 2 a 10 propágulos por parcela. Os tratamentos serão compostos pelos metais encontrados no diagnóstico e serão avaliados de forma isolada ou em interações. Será preparada solução nutritiva apropriada ao cultivo da espécie. Os propágulos serão cultivados nestas condições durante 3 meses. No primeiro mês, visando a aclimatação das plantas, será fornecida apenas a solução nutritiva sem os contaminantes e, em sequência, serão aplicados os tratamentos. Após dois meses, serão realizadas as coletas dos dados.

Análises

1-Biometria dos propágulos e análise de metaiscontaminantes

Serão avaliadas as seguintes variáveis: comprimento total inicial e final, comprimento do epicótilo inicial e final, volume de raiz, massa da matéria fresca e seca totais, massa da matéria seca por compartimento: raiz

(MSR), hipocótilo (MSH) e parte aérea (MSA), epicótilo e folhas (quando presentes). Ao final do experimento todos os componentes serão secos em estufa a 60°C até peso constante.

Após avaliação e obtenção da massa da matéria seca serão realizados cálculos da taxa de crescimento relativo (RGR) calculada pela fórmula $RGR = [\ln(\text{biomassa total}) - \ln(\text{biomassa inicial do propágulo})] / (\text{tempo do tratamento (semanas)})$ retirada de Pattinson *et al.* (1998) e utilizada em propágulos de *R. mangle* por Krauss e Allen (2003).

Para o cálculo da biomassa inicial dos propágulos, será realizada correlação entre comprimento total do propágulo e sua biomassa seca total. Será calculado o incremento de biomassa até o início dos tratamentos (peso inicial de coleta – peso início do tratamento) e incremento de biomassa final (peso final dos tratamentos – peso início dos tratamentos).

Para a análise da concentração dos metais contaminantes, as amostras secas serão enviadas para análise em laboratório credenciado.

Os dados serão submetidos à análise de variância e ao teste Tukey ou regressão conforme avaliação qualitativa ou quantitativa, respectivamente.

2-Análises fisiológicas

2.1. Pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofila *a*, *b*, total e de pigmentos carotenóides serão determinados pelo método de HPLC e expressos em $\mu\text{mol g matéria fresca}^{-1}$ (ARNON, 1949; LICHTENTHALER, 1987).

2.2. Fluorescência transiente da clorofila *a* (O-J-I-P)

A fluorescência da clorofila *a* será medida utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hanstech, King's Lynn, Norfolk, UK). Todas as medidas serão realizadas no período da manhã em folhas jovens totalmente expandidas (3ª ou 4ª folha a partir do ápice), previamente adaptadas ao escuro por um período suficiente para a oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons. A fluorescência transiente OJIP será analisada conforme o teste JIP com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER & STRASSER, 1995). Todas as medições ocorrerão sempre entre 7 e 10 h.

2.3. Assimilação de carbono e fluorescência modulada da clorofila *a*

A taxa de assimilação líquida do CO₂ (A), os parâmetros de trocas gasosas (g, C_i, C_i/C_a), a taxa de transpiração (T_r) e parâmetros da fluorescência modulada da clorofila *a* serão determinadas em folhas jovens completamente desenvolvidas, utilizando-se um analisador de gás no infravermelho IRGA (Ciras 2, PP Systems). Todas as medições ocorrerão sempre entre 8 e 10 h, com radiação saturante, na temperatura e umidade ambiente.

3- Atividade antioxidante/antirradicalar

A atividade antirradicalar será avaliada nos compostos majoritários (fenólicos e derivados, terpenos e alcaloides) isolados dos extratos e nos padrões analíticos em diferentes concentrações. Para fins de comparação, será determinada a atividade antioxidante dos extratos para analisar o efeito da matriz.

3.1. Método do radical ânion superóxido (O₂⁻)

A avaliação da capacidade de seqüestrar 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 proposto por Zhao *et al.* (2006). Serão adicionados 100 μL de amostra à solução de reação, que consistirá em 100 μL de uma solução de EDTA 30 mM; 100 μL 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 pré-incubada a temperatura ambiente por três minutos, será adicionado 100 μL de uma solução de xantina oxidase com concentração 0,75 U/mL e o volume será completado 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 será medida em 560 nm. A atividade de seqüestro do radical superóxido será calculada utilizando a equação:

$$O_2^- \text{ atividade antioxidante (\%)} = \left[1 - \frac{(S - S_B)}{(C - C_B)} \right] \times 100$$

Onde S, S_B, C e C_B são as absorvâncias da amostra, do branco da amostra, do controle e do branco do controler respectivamente.

3.2. Método do radical hidroxila (HO)

A atividade antirradicalar das amostras em estudos, e dos padrões analíticos em diferentes concentrações frente ao radical hidroxila será avaliada utilizando o método da 2-desoxi-D-ribose proposta por Zhao *et al.* (2006), com algumas modificações. FeCl₃•6H₂O e ácido ascórbico serão preparados em água mili-Q antes

do uso. Em um tubo, onde será efetuada a reação, será adicionado 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 o volume será completado até 1,0 ml com tampão fosfato. Em seguida, será incubado a 37 ° C durante 1 h, a reação será 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 em num banho a 37°C durante 15 min. Após amostras serão resfriadas, e o volume final ajustado para 5,0 ml com água deionizada e a absorvância será lida a 532 nm. A atividade antioxidante das amostras será calculada de acordo com a equação abaixo:

$$AA_{OH} = \left(1 - \frac{(S - S_B)}{(C - C_B)} \right) \times 100$$

Onde S, S_B, C e C_B são as absorvâncias da amostra, do branco da amostra, do controle e do branco do controlerespectivamente.

3.3. Método do radical peroxila (ROO•)

A avaliação da atividade antirradicalar das amostras frente ao ROO•, será realizada pelo método fluorimétrico, no qual emprega-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH₂-DA) como substrato (AMADO *et al.*, 2009). Para a montagem da placa de análise contendo 96 poças, a mesma será dividida em duas regiões, sendo que a região 1 (branco das medidas) corresponde as linhas A, B, C e D, e a região 2 corresponde as linhas E, F, G e H. As 3 primeiras poças, tanto na região 1 quanto na 2, são reservadas para o solvente, em que será adicionado 10 µl do solvente utilizado nas amostras. No restante da placa, será adicionado 10 µL de amostra em triplicata (3 poças) na região 1 e na região 2. Após será adicionado o tampão de reação (127,5 µL), em todas as poças da placa. Por fim, adiciona-se 7,5 µL de água ultrapurana região 1 e 7,5 µL da solução de ABAP (4 mmol • L⁻¹) na região 2. Imediatamente antes da análise da placa, no fluorímetro, será adicionado 10 µL de DCFH₂-DA (16 µmol • L⁻¹), previamente desacetilado. O fluorímetro será programado para manter a temperatura a 37°C e medir a fluorescência nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão) a cada 5 minutos, num intervalo total de 30 minutos. O tampão de reação utilizado nesta determinação será composto de HEPES (30 mmol • L⁻¹), KCl (200 mmol • L⁻¹) e MgCl₂ (1 mmol • L⁻¹). A desacetilação química do DCFH₂-DA, gerando o composto DCFH₂, será realizada com a adição de 2,0 mL de NaOH (0,01 mol • L⁻¹) em uma solução etanólica de (5 mmol • L⁻¹) de DCFH₂-DA, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após 30 minutos, será adicionado 10 mL de tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ (pH 7,4), composto de fosfato mono e dibásico, armazenando-se a solução em gelo até o momento do uso. 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:

$$AA_{ROO\bullet} = \left(1 - \frac{(F_A - F_{AB})}{(F_S - F_{SB})} \right) \times 100$$

Onde F_A é a fluorescência da amostra, com ABAP, F_{AB} é a fluorescência do branco da amostra, sem ABAP, F_S é a fluorescência do solvente utilizado nas amostras, com ABAP, e F_{SB} é a fluorescência do branco do solvente, sem ABAP.

3.4. Método do radical DPPH

A atividade antioxidante das amostras será avaliada da seguinte forma: 1500 µL da amostra será adicionada a 1480 µL da solução de DPPH e 20 µL da solução de trabalho. Paralelamente será conduzido um branco para cada amostra contendo 1500 µL da amostra e 1500 µL de solução de trabalho. Será necessário conduzir um branco para o DPPH para o cálculo da atividade antioxidante, dessa forma 1480 µL de DPPH serão adicionados a 1520 µL de solução de trabalho. Após 30 minutos de reação sob abrigo da luz as absorvâncias serão medidas em 522 nm. A porcentagem da atividade antioxidante frente ao radical DPPH será calculada conforme equação.

$$AA_{DPPH} = \left(\frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \times 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH, A e A_B são as absorvâncias da amostra e branco, respectivamente.

4- Análises Anatômicas

Para as caracterizações anatômicas, os tecidos coletados de todos os tratamentos serão fixados em solução de F.A.A. (formaldeído, ácido acético e etanol 50% na proporção de 0,5:0,5:9) por 48 horas, seguido de conservação em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Serão realizadas secções transversais e parâdermicas das amostras, sendo estas posteriormente clarificadas com hipoclorito de sódio 3% e coradas com safranina (1%), sendo utilizada água destilada para montagem das lâminas (BUKATSCH, 1972). As secções serão observadas em microscópio óptico e fotodocumentadas para posterior medição das características anatômicas: espessuras da epiderme, parênquima clorofiliano, parênquima aquífero e determinação do número de estômatos.

O material vegetal será obtido dos experimentos *ex situ* onde cada tratamento irá compor amostras compostas para análise da anatomia interna das folhas e de raízes. Material fresco de áreas não contaminadas em território capixaba serão coletadas para servirem de material de referência aos experimentos de contaminação por metais.

4.4 Variabilidade espacial e correlação de metais pesados em sedimentos e vegetação de mangue na região atingida pelos rejeitos de mineração na foz do RioDoce.

O experimento será conduzido em áreas de manguezal no norte do Espírito Santo e sul da Bahia. O monitoramento do teor de metais pesados será realizado em 8 (oito) áreas de manguezal durante 5 (cinco) anos. Serão coletadas anualmente 27 amostras de sedimentos em cada uma das áreas, durante os 5 anos de trabalho. Assim, serão amostradas 216 amostras por ano, totalizando 1.080 amostras de sedimentos durante todo o trabalho. No segundo ano de trabalho, após verificação de qual das 8 áreas apresenta teores de metais pesados considerados prejudiciais ao desenvolvimento da fauna e da flora, nesta área escolhida, será instalada uma malha quadrangular de 140 x 144 m (20.160 m²) com 100 pontos, com distância mínima de 5 m, em cada ponto amostral serão coletadas amostras de sedimentos e folhas de plantas da espécie *Rhizophora mangle* em cada ponto amostral.

Em cada um dos 100 pontos de amostragem, serão coletadas uma amostra de sedimento e uma amostra foliar da planta indicadora. As amostras deverão ser coletadas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento. As amostras deverão ser fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento. 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. Serão coletadas quatro folhas recém maduras e completamente desenvolvidas, as mesmas serão levadas ao laboratório, onde serão lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e, logo após, em água corrente e água destilada. Em seguida as folhas serão secas em estufa de circulação forçada a 65°C até massa constante, moídas em moinho tipo Wiley, passadas em peneira de malha de 0,841 mm e, então enviadas para análise. Em todas as amostras de sedimento e folhas serão analisados os seguintes metais: 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). Serão ainda analisados os teores de Ca e de carbonato em cada ponto amostral. O cálcio será extraído utilizando solução de KCl 1 molar e a sua determinação será realizada por espectrofotometria de absorção atômica. A análise de carbonato total será realizada em 1g da amostra seca, colocada em tubos de polietileno com tampa em rosca de 50mL. Após esta etapa será adicionado 20mL de HCl 1M, sendo a amostra homogeneizada e permanecendo em descanso por 12 horas, seguindo a metodologia adaptada de Morozova & Smith (2003). Posteriormente, a amostra será centrifugada para separação e retirada do sobrenadante e uma nova adição do mesmo volume de HCl 1M será realizada repetindo-se o mesmo procedimento. Após esta etapa será adicionado de 20mL de H₂O ultrapura. A amostra será novamente homogeneizada e centrifugada, retirando-se o sobrenadante e levando-se à estufa a uma temperatura de 80°C por ~72h. Por fim, será pesado o tubo e a parte sedimentada, onde a partir da diferença entre o peso inicial e final será obtido a massa decarbonato.

Teoria da Geoestatística

A amostragem clássica não leva em consideração a estrutura de dependência espacial, quando ela está presente na característica avaliada.

A estatística clássica vem a ser limitada, por isso torna-se necessário o uso de uma ferramenta que consiga detectar o grau de dependência entre as amostras, levando em consideração as coordenadas geográficas de cada ponto. A teoria da geoestatística pode ser empregada nesse caso, para descrever o padrão da variabilidade espacial e temporal do atributo medido.

Vieira *et al.* (1996) utilizaram conceitos de estabilidade temporal e escalonamento de semivariograma e analisaram simultaneamente, através de semivariogramas tridimensionais, a variabilidade espacial e temporal de alguns atributos de plantas.

Semivariograma

O semivariograma é uma das ferramentas da geoestatística, utilizada para determinar a variabilidade espacial de atributos das plantas de uma lavoura, expressando o grau de dependência espacial entre amostras, por meio de seus parâmetros. Os semivariogramas exigem que apenas a hipótese intrínseca seja satisfeita sendo, portanto menos restritiva, diferente do autocorrelograma que exige estacionaridade de segunda ordem (Berndtsson *et al.*, 1993). Por esse motivo o semivariograma pode ser usado em um maior número de situações.

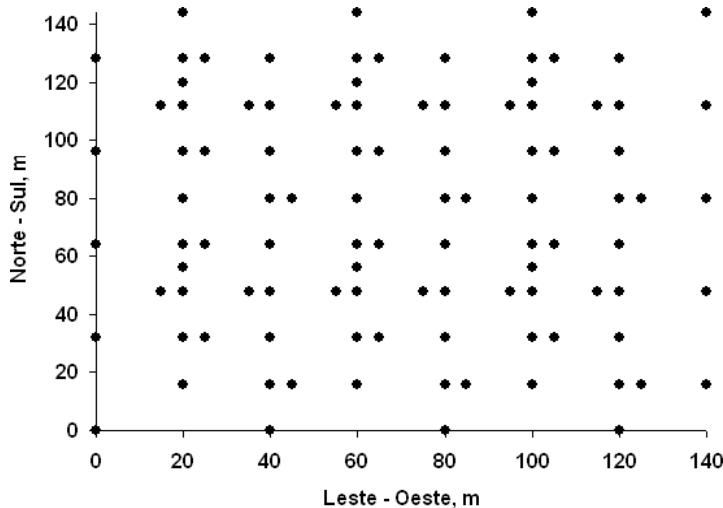


Figura 1. Representação esquemática da malha amostral na área em estudo.

O semivariograma é um gráfico que representa a semivariância dos dados $\gamma(h)$ em relação à distância correspondente que os separa (h), podendo ser definido como (Vieira *et al.*, 1983):

$$\gamma(h) = (1/2)E\{[Z(x_i) - Z(x_i + h)]^2\}$$

O qual pode se estimado por:

$$\hat{\gamma}(h) = \frac{\sum_{i=1}^{n(h)} [z(x_i + h) - z(x_i)]^2}{2n(h)}$$

Sendo $n(h)$ número de pares amostrais $[z(x_i); z(x_i + h)]$ separados pelo vetor h , sendo $z(x_i)$ e $z(x_i + h)$, valores numéricos observados do atributo analisado, para dois pontos x_i e $x_i + h$ separados pelo vetor h .

Normalmente, o conjunto de pontos amostrais se comporta como, intuitivamente, se deve esperar de dados de campo, ou seja, que as diferenças $[z(x_i) - z(x_i + h)]$ aumentem à medida que h , a distância que os separa, aumente.

Os componentes, efeito pepita (C_0) e patamar ($C_0 + C$) são utilizados para determinar o grau de dependência espacial (GD) conforme equação (Cambardella *et al.*, 1994):

$$GD = \frac{100}{Co Co + C}$$

Semivariogramas que apresentam grau de dependência espacial menor ou igual a 25% têm forte dependência espacial. A dependência é moderada quando esta relação variar de 25 a 75% e fraca quando esse valor for superior a 75%.

O semivariograma é uma função do vetor h e, portanto, depende de sua direção e magnitude. Dependendo do comportamento do gráfico do semivariograma em diferentes direções ele pode ser chamado de isotrópico ou anisotrópico (Vieira, 2000).

Para obtenção dos mapas tridimensionais de relevo e dos atributos estudados será utilizado o programa SURFER (Golden Software, 1997), e os dados serão interpolados por meio da técnica da krigagem, a qual utiliza os parâmetros do semivariograma.

Para o ajuste dos modelos matemáticos aos semivariogramas será utilizado o método de validação "Jack-knifing", no qual serão analisados os valores de média e variância dos erros reduzidos (Souza, *et al.*, 1997), os quais serão considerados os modelos: esférico, exponencial, linear e gaussiano.

Os pontos demarcados servirão de base para a coleta de dados de folhas e produtividade. Para georreferenciamento da área, será utilizado um par de receptores GPS TechGeo®, modelo GTR G² geodésico. Os dados após serem processados pela Rede Brasileira de Monitoramento Contínuo (RBMC) do IBGE apresentarão precisão de 10 mm+ 1ppm.

Este projeto contribuirá para o conhecimento do comportamento espacial dos metais pesados em sedimentos em na planta indicadora, possibilitando conhecer melhor o comportamento em termos de distribuição espacial de metais pesados no ambiente de manguezal. O projeto proporcionará um treinamento em pesquisa de alunos vinculados, bem como dos alunos que se destacam pelo desempenho acadêmico do curso de Biologia, qualificando-os para futuros programas de pós-graduação.

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

Comportamento hidrodinâmico

Monitoramentos de fluxos d'água nos estuários dos rios São Mateus, Mariricu e Piraquê: Serão realizadas 12 campanhas de monitoramento com ADCP, com periodicidade mensal, em duas seções nos locais especificados. As medições serão realizadas durante 12 horas, para acompanhar o ciclo de maré. Próximos aos locais de medição serão instalados marégrafos, para acompanhamento da variação do nível d'água. Os resultados obtidos serão utilizados para caracterização do ambiente e no estudo de modelagem numérica. Os parâmetros Temperatura e Salinidade serão monitorados nas seções onde serão feitas as medições de fluxo d'água, seguindo a mesma logística de deslocamento.

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 variações de maré.

Coleta de amostras de sedimento para análise de metais pesados

Serão feitas coletas de sedimentos de fundo nas mesmas datas das campanhas de dinâmica, nos mesmos locais das medições de fluxo d'água, sendo uma amostra em cada estuário. As amostras serão analisadas pelas equipes do Anexo 3.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, J. A.; Reinert, D.J.; Firorin, J.E. Variabilidade de solo e planta em Podzólico Vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 20:151-157,1996.
- Alves RRN, Nishida AK (2002) A ecdise do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* L. (Decapoda, Brachyura) na visão dos caranguejeiros. *Interciência* 27:110-117.
- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (ANA). **Espírito Santo**. 58 p. s.d. Documento obtido na internet.
- BERTOLANI, F. C.; VIEIRA, S. R. Variabilidade espacial da taxa de infiltração de água e espessura do horizonte A, em um Argissolo Vermelho-Amarelo, sob diferentes usos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 25:987-995,2001.

- BRANCO, Joaquim Olinto. Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 36, n. 1, p. 133-148, 1993.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Os Ecossistemas Brasileiros e os Principais Macro-vetores de Desenvolvimento. Subsídios ao Planejamento da Gestão Ambiental.** Brasília,1996.
- Bouillon, S.; Mohan, P. C., Sreenivas, N, Dehairs, F. 2000. Sources of suspended organic matter and selective feeding by zooplankton in an estuarine mangrove ecosystem as traced by stable isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*208:79-92.
- Bovini, M.G. 2010. A new combination in the genus *Talipariti* (Malvacee). *Rodriguésia* 61 (suplemento): 19-21.
- Burton, G. A. 1992. Sedimentary toxicity assessment. Lewis Publishers. Chelsea, MI, p.457.
- Cambardella, C. A.; Moorman, T. B.; Novak, J. M.; Parkin, T. B.; Karlen, D. L.; Turco, R. F.; Konopka, A. E. Field-scale variability of soil properties in central Iowa soils. **Soil Science Society of America Journal**, 58:1501-1511,1994
- Carvalho, F.L.; Souza, E.A. & Couto, E.C.G. 2007. Composição e Distribuição dos Braquiúros Crustacea, Decapoda) no Manguezal do Acuípe (UNA, Bahia). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu, MG.
- Costa-Boddeker, S.; Hoelzmann, P.; Thuyên, L. X.; Huy, H. D.; Nguyen, H. A.; Richter, O.; Schwalb, A. Ecological risk assessment of a coastal zone in Southern Vietnam: Spatial distribution and content of heavy metals in water and surface sediments of the Thi Vai Estuary and Can Gio Mangrove Forest. **Marine Pollution Bulletin**, xxx:xxx-xxx,2016
- Cunha, S.R., Tognella-De-Rosa, M.M.P., Costa, C.S.B. Salinity and flooding frequency as determinant of mangrove forest structure in Babitonga Bay, Santa Catarina State, Southern Brazil. *Journal of Coastal Research*. 39:1175 - 1180.2004.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** Brasília, DF: Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 370,1999.
- Fidalski, J.; Tormena, C. A.; Scapim, C. A. Espacialização vertical e horizontal dos indicadores de qualidade para um Latossolo Vermelho cultivado com citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 31:9-19,2007.
- Fisher, R. A. **Statistical methods and scientific inference.** Edinburg, Oliver & Boyd, 1956.175p.
- GOLDEN SOFTWARE, INC. Surfer for Windows-User guide. Golden: **Golden Software**, Colorado, 1997. 340 p.
- Fry, B.; Smith, T. J. III 2002. Stable isotopes studies of red mangrove and filters feeds from Shark river estuary, Florida. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70:871-890.
- Gotelli, N. J. e Ellison, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia.** Porto Alegre, Artmed, 320p.2012.
- Granek, E. F., Compton, J. E. Phillips, D. E. 2009. Mangrove exported nutrient incorporation by sessile coral reef invertebrates. *Ecosystems* 12:462-472.
- Heald, E.J.; Odum, W.E. 1970. The contribution of mangrove swamps to Florida fisheries. *Proc. Gulf. Carib. Fish. Inst.* 22:730-35.
- Herz, R. 1991. **Manguezais do Brasil.** São Paulo, IOUSP.

- McKee, K.L. 2004. Global Change Impacts on Mangrove Ecosystems. *USGS, Fact sheet* 2004-3125. 3 p. Universidade Autônoma de Barcelona(2015)
- Pascoalini, S. S. Eficiência Fotossintética de Manguezais na Baía de Vitória, ES. Dissertação de Mestrado, Programa de Oceanografia Ambiental. 61 p.2014.
- Pinheiro, M.A.A.; Rollo, M.M., Jr.; Hattori, G.Y. 2007. Identificação de habitats potenciais para o caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) na ilha da coroa do sapo, iguape (SP), Brasil, utilizando imagens IKONOS® II. Anais do XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar - XII COLACMARFlorianópolis.
- Rosa FR, Lopes IR, Sanches VQA, Rezende EK. Distribuição de caranguejos Trichodactylidae (Crustacea, Brachyura) em alagados do Pantanal Mato-Grossense (Brasil) e sua correlação com a proximidade do rio Cuiabá e cobertura vegetal. *Pap. Avulsos Zool. (São Paulo)* [online]. 2009, vol.49, n.24, pp.311-317. ISSN 0031-1049.<http://dx.doi.org/10.1590/S0031-10492009002400001>.
- Saenger, P.; Heagerl, E.J.; Davie, J.D.S. 1983. Global status of mangrove ecosystems. *Environmentalist*, 3(supl. 3):1-88.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintron, G. **Guia para estudo de áreas de manguezal, estrutura, função e flora.** Caribbean Ecological Research, São Paulo, 1986.150p.
- Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Soares, M.L.G., Tognella-De-Rosa, M.M.P. Brazilian mangroves. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, v.3, p.561-570, 2000.
- Silva, M. S. C. **Indicadores de qualidade do solo em sistemas agroflorestais em Paraty, RJ.** Seropédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. 54 p. (Dissertação de Mestrado).
- Souza, L. S.; Cogo, N. P.; Vieira, S. R. Variabilidade de propriedades físicas e químicas do solo em um pomar cítrico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 21:367-372,1997.
- Stone, L. F.; Silveira, P. M. Efeitos do sistema de preparo e da rotação de culturas na porosidade e densidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 25:395-401,2001.
- Sundaramanickam, A.; Shanmugam, N.; Cholan, S.; Kumaresan, S.; Madeswaran, P. Balasubramanian, T. Spatial variability of heavy metals in estuarine, mangrove and coastal ecosystems along Parangipettai, Southeast coast of India. **Environmental Pollution**, 218:186-195,2016.
- Spalding, M. D.; Kainuma, M.; Collins, L. 2010. **World Atlas of Mangroves.** ITTO,ISME.
- Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson M, Halpern BS, Jorge MA, Lombana A.,Lourie SA, Martin KD, McManus E, Molnar J, Recchia CAE, Robertson J. Marine Ecoregion of the World: a Bioregionalization of Coastal and Shelf Regions. *Bioscience* 57 (7): 573-83.2007.
- Sheaves, M. & Molony, B. 2000. Short-circuiting in the mangrove food chain. *Mar. Prog. Ecol. Ser.* 199:97-109.
- Tognella-De-Rosa MMP. **Manguezais Catarinenses, Baía da Babitonga e Rio Tavares: uma abordagem ecológica e econômica.** Tese de Doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 2000. 216 +anexos.
- Zar JH. **Biostatistical Analysis.** Ed. Prentice Hall, New Jersey. 1996

**ALTERAÇÕES ECOLÓGICAS NA DINÂMICA DOS MANGUEZAIS E VEGETAÇÃO DE
RESTINGA SOB INFLUÊNCIA DOS SEDIMENTOS PROVENIENTES DO RIO DOCE
(ANEXO 5)**

SUB-PROJETO: RESTINGA

EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Diolina Moura Silva (coord)	Coordenação da equipe de Restinga Avaliações da atividade fotossintética e produção de biomassa	UFES
Luis Fernando Tavares de Menezes	Distribuição florística e fitossociológica; Dinâmica da vegetação; Interrelação com os padrões morfo-sedimentológicos	UFES
Valquiria Ferreira Dutra	Escolha e confirmação das áreas amostrais; Inventário taxonômico; Depósito em acervo de herbários	UFES
Elisa Mitsuko Aoyama	Avaliação da distribuição anatomo-florística e fitossociológica; Dinâmica da vegetação.	UFES
Geraldo Rogério Fautini Cuzzuol	Metabolismo dos carboidratos Produção de biomassa	UFES
Silvia Tamie Matsumoto	Impacto cito-genético, florístico e fitossociológico; Efeitos ecotoxicológicos na dinâmica da vegetação.	UFES
Viviana Borges Corte	Monitoramento da capacidade de recuperação; Sistema anti-oxidantes	UFES
Oberdan José Pereira	Inventário da estrutura vegetal das áreas amostrais Avaliação da distribuição florística e fitossociológica; 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; Teores de pigmentos fotossintéticos	UFPeI
Flávia Cristina Pinto Garcia	Identificação do material vegetal; Taxonomia de fanerógamas.	UFV
Adriano Nunes-Nesi	Componentes estruturais; compostos secundários; Produção de biomassa; Perfil metabólico da comunidade vegetal	UFV
Wagner Luiz Araújo	Compostos secundários e produção de biomassa; Sistemas anti-oxidantes; Perfil metabólico da comunidade vegetal.	UFV
Marcelo da Costa Souza	Distribuição florística e fitossociológica; Dinâmica da vegetação.	UFRRJ
Pós Doutor	Membro de Equipe	UFES
Iniciação Científica	Membro de Equipe	UFES

Iniciação Científica	Membro de Equipe	UFES
Iniciação Científica	Membro de Equipe	UFES
Iniciação Científica	Membro de Equipe	UFES
Profissional Mestre I	Membro de Equipe	UFES
Profissional Mestre I	Membro de Equipe	UFES
Profissional Mestre I	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES
Técnico Nível Médio	Membro de Equipe	UFES

2. ESCOPO

Serão amostradas áreas atingidas pelos “sprays” das ondas do mar, a vegetação rasteira com sedimentos e o solo florestal visando obter um inventário da estrutura e parâmetros fitossociológicos de oito áreas da formação Restinga. A investigação se estenderá às diferentes formas de respostas ao impacto ocorrido. Estas respostas deverão ser investigadas temporal e espacialmente ao longo dos 12 meses de estudo. Medidas de assimetria fluante de espécies da comunidade vegetal serão utilizadas como um indicativo de estresse ambiental. Para isso a variação da assimetria fluante será avaliada nas oito áreas. Ainda, de maneira observacional, será investigado como diferentes gradientes de poluição alteraram a qualidade foliar e as taxas de herbivoria. Aspectos pontuais como taxa de mortalidade de jovens e adultos (citado no item 6 do Anexo 5) deverão ser comparados com os registros anteriores que a equipe possui (artigos, teses, material depositado nos herbários) esclarecendo a evolução dos estágios sucessionais da comunidade vegetal da Restinga. Em conjunto com o inventário da estrutura e das análises fitossociológicas serão realizadas as avaliações de campo da atividade fotossintética (trocas gasosas, fluorescência da clorofila, teores de pigmentos fotossintéticos e nível de tolerância aos resíduos no solo e na água) dos indivíduos.

3. OBJETIVO

Avaliar o estado de conservação das espécies da biota impactada (Restinga).

3.1 Objetivos específicos

- Inventariar a flora da formação arbustiva-herbácea e arbórea de oito áreas da formação Restinga (Meta 1);
- Sugerir o ingresso de novas espécies da Restinga no rol de ameaçadas (Meta 1);
- Analisar os efeitos dos rejeitos, ainda contidos no solo, na sobrevivência da vegetação jovem e adulta da vegetação da Restinga (Meta 2);
- Avaliar a estrutura da vegetação e a dinâmica temporal da comunidade vegetal das oito áreas amostrais (Meta 2);
- Avaliar a atividade fotossintética (trocas gasosas, fluorescência da clorofila, teores de pigmentos fotossintéticos) da vegetação (halófila-psamofila, arbustiva-herbácea e arbórea) identificada e coletada no inventário taxonômico e fitossociológico nas oito estações da formação Restinga (Meta 3);

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Inventário de 50% da estrutura (halófila-psamofila, arbustiva-herbácea e arbórea) de oito áreas da formação Restinga

Justificativa - Inventário da estrutura halófila-psamofila, arbustiva-herbácea e arbórea das **oito estações [descritas na Tabela 2, página 17, item 6 da TR4 Anexo 5, corrigida no Plano de Trabalho de 26/10/2017 para Coordenadas UTM (datum SIRGAS2000), Quadro 12]**¹ ao longo do ambiente impactado. O material vegetal será identificado e registrado mensalmente durante os 12 meses de monitoramento do projeto, acompanhado do depósito no acervo de Herbários com registros fotográficos.

¹ No Cronograma Operacional foi programada, no mês 2, expedição de reconhecimento para confirmação ou alteração da(s) área(s) pré-determinada(s) no item 6, Anexo 5 da TR nº 4.

Meta 2- Inventário e análises dos parâmetros fitossociológicos nas oito áreas de diferentes fitofisionomias da formação Restinga

Justificativa - Análises dos parâmetros fitossociológicos nas oito áreas de diferentes fitofisionomias da formação Restinga visando monitorar a dinâmica da vegetação, medindo-se características funcionais e sua variação espacial e temporal trimestralmente durante os 12 meses do projeto. O estudo de fitossociologia não será mensal, mas foi prevista uma possível ida mensal a campo considerando o tamanho da equipe e as várias atividades que serão desenvolvidas em cada restinga a ser estudada. Existe uma frequência trimestral de análise e coleta de material para monitorar o possível impacto (conforme consta do Anexo 5, TR4).

Meta 3- Atividade fotossintética da vegetação identificada e coletada no inventário taxonômico e fitossociológico nas oito estações da formação Restinga

Justificativa - Pretende-se avaliar as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* (transiente e modulada) nas espécies das oito estações amostrais da Restinga visando obter informações detalhadas sobre os eventos do metabolismo primário da comunidade vegetal. A utilização prática da fluorescência transiente da clorofila *a* tem demonstrado, claramente, que pode explicar e prever o desempenho de amostras fotossintéticas sob várias condições, especialmente quando é utilizado em paralelo com as técnicas de fluorescência modulada por imagens, trocas gasosas e, como em condições de alta luminosidade e temperatura as plantas precisam enfrentar excesso de energia de excitação da luz e os danos do calor que provocam o estresse oxidativo e fotoinibição, análises da atividade do sistema antioxidante e o conteúdo e natureza dos carotenoides também serão avaliados.

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>
Reconhecimento e marcação das áreas amostrais Listagem das espécies coletadas Identificação das espécies Inventário taxonômico Registro fotográfico Depósito em acervos dos herbários	Valquíria F. Dutra Flavia C. P. Garcia
Coleta e envio dos sedimentos para análise química Coleta e envio de espécimes (folhas, ramos e/ou raízes) para análise química Coleta de sementes Testes de viabilidade Testes citotóxicológicos Identificação dos promotores na microbiota do solo	Viviana Borges Corte Sílvia T. Matsumoto Andrea M Bittencourt
Dados estruturais da vegetação Quantificação de área basal Dados de frequência absoluta e relativa Banco de dados específico das formações vegetais sob análise Amostras de material dissecado depositados em herbário para identificação botânica e avaliação do status de conservação	Luis Fernando T. Menezes Oberdan José Pereira Marcelo C. Souza
Das espécies identificadas serão disponibilizados dados da Fotossíntese líquida Transpiração Respiração no escuro 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 <i>in situ</i>	Diolina Moura Silva Marcos Antonio Bacarin

Teores de pigmentos: clorofila a, Clorofila b, Carotenóides (carotenos e xantofilas), antocianinas;	
Lâminas histológicas para análise da anatomia foliar das espécies identificadas;	Elisa Mitsuko Aoyam
Atividade enzimática e concentração de componentes dos sistemas antioxidantes;	Viviana Borges Corte
Concentração de celulose, hemicelulose e ligninas Concentração de carboidratos solúveis e insolúveis;	Geraldo Rogério F. Cuzzuol
Concentração dos principais compostos primários e secundários do metabolismo vegetal.	Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise e processamento dos dados que constituirão o inventário da estrutura da comunidade da formação Restinga	Valquiria F. Dutra
Análise e processamento dos dados que constituirão a fenologia de espécies da formação Restinga	Valquiria F. Dutra Flavia C. P. Garcia
Análise, identificação, processamento do registro fotográfico	Valquiria F. Dutra Flavia C. P. Garcia
Identificação das espécies Envio a especialistas	Valquiria F. Dutra Flavia C. P. Garcia
Análise e processamento dos dados sedimentológicos	Andrea M Bittencourt Viviana Borges Corte Sílvia T. Matsumoto
Envio das exsicatas para os acervos dos Herbários	Valquiria Ferreira Dutra
Identificação de espécies com maior valor de importância a partir dos dados estruturais	Luis F. T. Menezes Oberdan José Pereira
Identificação de espécies - Avaliações comparativas. Indicação de espécies chave para recuperação ambiental de formações vegetais específicas	Luis F. T. Menezes Oberdan José Pereira Marcelo C. Souza
Avaliação do grau de ameaça das espécies ocorrentes nas áreas inventariadas.	Luis F. T. Menezes Oberdan José Pereira
Processamento, análise e interpretações dos dados das trocas gasosas, fluorescência de clorofila e pigmentos foliares	Diolina Moura Silva Marcos. Bacarin Wagner Luis Araujo
Cálculos e confecção de planilhas contendo teores dos pigmentos, carboidratos, componentes estruturais, teores de metais e semi-metais nas raízes, caule e folhas, cálculos da atividade do sistema anti-oxidante; análises das lâminas histológicas.	Elisa Mitsuko Aoyama Viviana Borges Corte
Cálculos e confecção de planilhas contendo os teores de carboidratos estruturais	Adriano Nunes-Nesi Geraldo R. F. Cuzzuol Wagner Luiz Araújo
Construção do perfil metabólico e produção de biomassa	Adriano Nunes-Nesi Wagner Luiz Araújo

As análises finais irão comparar os resultados obtidos durante o monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Meta 1- Inventário de 50% da estrutura (halófila-psamofila, arbustiva-herbácea e arbórea) de oito áreas da formação Restinga

As coletas serão realizadas por meio de caminhamento aleatório na região das oito estações [descritas na Tabela 2, página 17, item 6 da TR4 Anexo 5, corrigida no Plano de Trabalho de 26/10/2017 para Coordenadas UTM (*datum* SIRGAS2000), Quadro 12] da Restinga, cobrindo toda a área, onde serão

coletados apenas os indivíduos férteis encontrados, utilizando os métodos usuais de trabalhos de campo e de herborização (Fidalgo e Bononi, 1989). Serão feitos registros fotográficos e coletados dados referentes às cotas altitudinais e coordenadas geográficas com uso GPS. Amostras em sílica gel serão coletadas para futuros trabalhos moleculares. Após identificação, os espécimes coletados serão depositados no acervo dos Herbários VIES, SAMES e VIC.

O sedimento de cada uma das oito estações será amostrado para análises granulométricas, química de rotina e matéria orgânica. Serão também amostrados material vegetal (folha e raízes) para medição das concentrações de metais.

Meta 2- Inventário e análises dos parâmetros fitossociológicos nas oito áreas de diferentes fitofisionomias da formação Restinga

Nesse período de 12 meses será realizado o levantamento florístico das formações vegetais da restinga, nos diferentes pontos de amostragem.

Especialmente, para a área da formação halófitas, será realizado o levantamento estrutural da vegetação, com finalidade de se entender se há variação nos padrões de densidade e riqueza das espécies de acordo com o distanciamento da foz do rio do Doce. Nossa hipótese é de que, a estruturação da comunidade tenha se alterado de acordo com o acúmulo de rejeitos provenientes do salgueiro e acumulado nas plantas. Em cada ponto serão instaladas 25 parcelas permanentes (o número de parcelas será definido de acordo com o perfil da praia)² e acompanhado mensalmente a dinâmica da vegetação. Cada parcela terá 1m quadrado. Os trechos onde há vegetação arbustiva / arbórea terá seu inventário florístico e estrutural iniciado ou reavaliado, já que a equipe de trabalho possui áreas de estudo próximas aos pontos de amostragem.

Na vegetação arbustiva/arbórea será realizado o levantamento em 0,1 ha da vegetação em cada área. Serão alocadas três parcelas contíguas de 10 x 10m (Mueller-Dombois & Ellenberg, 1974), distribuídas em 1 faixas paralelas ao mar. Serão incluídos no censo todos os indivíduos arbustivos ou arbóreos com 2,5cm ou mais de diâmetro do tronco à altura do peito (DAP)³ que corresponde a aproximadamente a 1,5cm de diâmetro do tronco à altura do solo (DAS), inclusive lianas. Considerando-se que árvores mortas e em pé constituem indicativo da dinâmica sucessional da floresta, esses indivíduos serão também amostrados. Cada indivíduo amostrado receberá uma plaqueta numerada e seu DAP medido. Indivíduos perfilhados só foram marcados e medidos quando um dos ramos possuía DAP igual ou superior a 2,5cm. Árvores com sapopemas, cujo alargamento das raízes se iniciava a 1,30m ou mais acima do solo tirão seus diâmetros medidos a 20cm acima do alargamento, conforme empregado em levantamentos deste tipo. Simultaneamente, serão coletadas amostras para herborização, de acordo com técnicas usuais.

Meta 3- Atividade fotossintética (Trocas Gasosas, Fluorescência da Clorofila a e Pigmentos Fotossintéticos)

Cinco indivíduos de cada espécie identificadas no inventário da formação Restinga (formação halófila-psamófila e seus interiores) serão selecionados para avaliação da Cinética de Emissão da Fluorescência Rápida e da Fluorescência modulada da clorofila a (Li et al., 2014; Strasser et al., 2010, Bacarin et al., 2016, Chen et al., 2016).

As trocas gasosas serão avaliadas utilizando-se um analisador de gás no infravermelho, portátil, (IRGA, modelo LCi SD, ADC BioScientific Ltd., England) obtendo-se a taxa líquida de assimilação do CO₂ (A), a condutância estomática ao vapor de água (gs) a transpiração (E), e a concentração intercelular de CO₂ (Ci). A condutância estomática será usada para quantificar a eficiência do uso da água durante as estações seca e chuvosa (Lavinsky et al., 2016).

O teor relativo de clorofila será estimado com o uso de um clorofilômetro portátil (SPAD-502, Konica Minolta Optics, Inc.) e expresso como índice SPAD. Serão realizadas medidas em campo, nas mesmas folhas utilizadas na análise da fluorescência da clorofila a e trocas gasosas (Faria-Silva., 2017). Amostra das folhas utilizadas para a análise dos teores de clorofilas totais serão utilizadas em laboratório para análises espectrofotométricas com extração em DMSO (Lichtenthaler e Buschmann, 2001). As concentrações foliares

² Se estabelece o número máximo de parcelas, mas o quantitativo de parcelas pode ser menor, devido a ação do mar neste tipo de formação, acarretando o seu estreitamento.

³ O valor, para este parâmetro, não é correto! Não se mede troncos a altura do solo em 1,5 para vegetação arbustiva arbórea. Inadequado para avaliações em restinga!

de xantofilas (neoxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína e zeaxantina) e carotenos (α -caroteno e β -caroteno) serão ensaiadas em cromatógrafo líquido de alto desempenho (Matos et al., 2009).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bacarin, M. A., Martinazzo, E. G., Cassol, D., Falqueto, A. R., Silva, D. M. 2016. Daytime variations of chlorophyll a fluorescence in pau d'alto seedlings. *Revista Árvore*, v.40, n.6, p.1023-1030.
- Chen, Y. E., Cui, J. M., Li, G. X., Yuan, M., Zhang, Z. W., Yuan, S., Zhang, H. Y. 2016. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, v.60, p.139-147.
- Faria-Silva L, Gallon CZ, Purgatto E, Silva DM (2017) Photochemical metabolism and fruit quality of Ubá mango tree exposed to combined light and heat stress in the field. *Acta Physiol Plant* 39:238 . doi: 10.1007/s11738-017-2533-3
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263
- Fidalgo, O., Bononi, V.L. R. Técnicas de coleta, preservação e herborização do material botânico. São Paulo: Instituto de Botânica. 1989.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell Online* 16: 3304-3325
- Laloo, 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. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.1471–1479.
- Lavinsky, A. O., Detmann, K. C., Reis, J. V., Ávila, R. T., Sanglard, M. L., Pereira, L. F., Sanglard, L. < V. P., Rodrigues, F. A., Araújo, W. L., DaMatta, F. M. Silicon improves rice grain yield and photosynthesis specifically when supplied during the reproductive growth stage. *Journal of Plant Physiology*, v.206, p.125-132, 2016.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS. *Curr Protoc Food Anal Chem* F4.3:1–8. doi: 10.1002/0471142913
- Mesa, J., Rodríguez-Llorente, I. D., Pajuelo, E., Piedras, J. M. B., Caviedes, M. A., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E. 20165 Moving closer towards restoration of contaminated estuaries: Bioaugmentation with autochthonous rhizobacteria improves metalrhizoaccumulation in native *Spartina maritima*. *Journal of Hazardous Materials*, v.300, p.263–271.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50: 1093-1106
- 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.
- Singh, N.P.; Mccoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, New York, v.175, n.1, p.184-191, 1988.
- Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Qiang, S.; Goltsev, V., 2010. 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.

**MONITORAMENTO DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS
ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE, PLATAFORMA CONTINENTAL E ÁREAS
PROTEGIDAS ADJACENTES (ANEXO 6)**

**SUB-PROJETO: Monitoramento cetáceos a partir de técnicas de sobrevoos,
imageamento subaquático e hidroacústica**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Agnaldo Silva Martins	Coordenador temático Anexo 6 - coordenador do subprojeto de sobrevoos e acústica - coordenador e executor do projeto de monitoramento do uso de habitats com drones e ROVs	UFES
Artur Andriolo	Coordenador do projeto de monitoramento hidroacústico de cetáceos	UFJF
Profissional Mestre II /Profissional sênior II	Pesquisador	UFES
Profissional Mestre II /Profissional sênior II	Pesquisador	UFES
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	UFJF
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	UFJF
Técnico de Nível Superior	Pesquisador	UFJF
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFJF
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFJF
Pós-Doutorado	Pesquisador	UFES
Técnico nível médio	Pesquisador	UFJF
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

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*) (MMA, 2014). O entendimento dos padrões de uso e deslocamento dessas espécies 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.

O enfoque da realização de observações diretas a partir de plataformas móveis semi-autônomas como VANTs (Veículos aéreos não tripulados, também conhecido como Drones) e veículos tripulados tem ganhado atenção da comunidade científica por permitir a obtenção de informações pouco disponíveis pelos outros enfoques e por terem se tornado progressivamente mais acessíveis devido ao avanço tecnológico.

Os vertebrados marinhos podem ainda ser utilizados como amostradores do ambiente, ao usarem-se equipamentos de sensoriamento remoto. Através destes equipamentos também é 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.

Para o acompanhamento de tartarugas marinhas, o censo aéreo não é a metodologia mais adequada, mas o registro dos quelônios eventualmente detectados por estes sobrevoos serão registrados (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio). Para o monitoramento de aves, por sua vez, o Anexo 6 não prevê em nenhum momento o uso de veículos aéreos tripulados para estudar aspectos de distribuição, área de vida ou abundância de aves, as quais, por suas características biológicas são incompatíveis com essas metodologias.

Para a biologia, compreender a acústica de animais e do ambiente pode revelar aspectos importantes para a conservação de uma espécie, como sua biologia, ecologia e possíveis impactos que esteja ocorrendo em um determinado local. Devido a dificuldade de observação de cetáceos em seu ambiente natural, principalmente em áreas com águas turvas, esse tipo de estudo trouxe vantagens para pesquisas com esse grupo.

Por se tratarem de seres que enxergam o mundo por meio de ondas sonoras, o desenvolvimento da bioacústica e de estudos de ecologia acústica em cetáceos é fundamental para a conservação destas espécies (Laiolo, 2010). Técnicas acústicas vêm sendo aplicadas para a obtenção de parâmetros ecológicos populacionais tais como densidade e abundância (Hatch et al., 2012; Van Parijs et al., 2009; Marques et al., 2013).

3. OBJETIVO

- 1) Avaliar e monitorar, por um período de 12 meses a distribuição, abundância e área de vida de mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 2) Determinar e monitorar por um período de 12 meses, associação de mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 (objetivo 1) - Estudos de distribuição e abundância de toninhas por censos aéreos tripulados

Avaliar e monitorar, por um período de 12 meses a distribuição, abundância e área de vida de toninhas em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Realização dos sobrevoos, estimativas de abundância, elaboração de relatórios. Censo aéreo de toda a área realizado em 45 dias no verão/início de outono.

Meta 2 (objetivo 1) - Estudos de distribuição e abundância de baleia jubarte por censos aéreos tripulados

Avaliação e monitoramento, por um período de 12 meses da distribuição, abundância e área de vida de baleia jubarte em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Realização dos sobrevoos, estimativas de abundância, elaboração de relatórios. Censo aéreo de toda a área realizado em 60 dias no inverno/início de primavera .

Meta 3 (objetivo 2) - Monitoramento de associação de cetáceos com micro-habitats costeiros

Determinar e monitorar por um período 12 meses, associação mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Realização de sobrevoos regulares, realização de sobrevoos de oportunidade, processamento dos vídeos, análises numéricas, elaboração de relatórios. Campanhas mensais.

Meta 4 (objetivo 2) - Identificação e descrição de micro-habitats

Identificar micro-habitats costeiros associados a concentrações de cetáceos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Realização de campanhas de mar com filmagens subaquáticas com o uso de ROV, processamento dos vídeos, análises numéricas, elaboração de relatórios. Campanhas semestrais.

Meta 5 (objetivo 2) - Avaliações acústicas de cetáceos

Determinação do uso da área pelos animais, através da interpretação de seus sinais sonoros (taxa e períodos de emissão das vocalizações e dos sons de ecolocalização). Avaliação das características físico-químicas do ambiente que possuem maior influência sobre os parâmetros de frequência e intensidade de

sons modulados e pulsados dos cetáceos sob diferentes escalas de variação espacial na região através de um delineamento amostral hierárquico. Realização das campanhas de mar, análise dos resultados, elaboração de relatórios. Realização de campanhas anuais.

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>
<p>Registros de ocorrência de toninha (posição geográfica por indivíduo identificado).</p> <p>Registros de ocorrência de baleia jubarte (posição geográfica por indivíduo identificado).</p> <p>Registro de ocorrência de grupos de cetáceos (espécie, número de indivíduos e posição geográfica)</p> <p>Identificação e descrição dos habitats de maior associação com grupos de cetáceos</p> <p>Descrição da composição de cada grupo de cetáceos registrado, tipo e o comportamento. Lista de categorias comportamentais de acordo com os etogramas empregados para cada espécie</p>	<p align="center">Agnaldo Silva Martins (Daniel Danilewicz – GEMARS)</p> <p align="center">Agnaldo Silva Martins</p> <p align="center">Artur Andriolo</p>
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>Análise da densidade de indivíduos utilizando o estimador Horvitz-Thompson</p> <p>Análise da distribuição espacial das espécies através de modelos de estimativa superficial da densidade</p> <p>Análise da distribuição espacial de grupos de cetáceos usando técnicas de SIG ao redor da foz do Rio Doce</p> <p>Análise espacial da associação de habitats identificados com grupos predominantes.</p> <p>As análises das emissões sonoras e a gravação da imagem em tempo sincronizado com o oscilograma da trilha sonora gravada, procurando relacionar a vocalização emitida com o comportamento</p>	<p align="center">Agnaldo Silva Martins (Daniel Danilewicz – GEMARS)</p> <p align="center">Agnaldo Silva Martins</p> <p align="center">Artur Andriolo</p>

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Distribuição e abundância

Para avaliação da distribuição, abundância e área de vida (objetivo 1), deverão ser utilizados monitoramentos aéreos com aeronaves tripuladas. Deverão ser realizados dois monitoramentos por ano, sendo um destinado a avaliação de pequenos mamíferos e tartarugas (toninha, boto-cinza, tartarugas marinhas em geral) e outro destinado a avaliação da baleia-jubarte.

Os sobrevoos serão realizados em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Os sobrevoos destinados aos pequenos mamíferos e tartarugas terão como limite oceânico a isóbata de 25m, e os destinados a baleia-jubarte a isóbata de 500m.

Os sobrevoos deverão ser realizados usando o método de amostragem por distâncias ao logo de transectos lineares (Buckland *et al.*, 2001). O método de transecções lineares assume que a densidade de animais na área amostrada, retângulo de comprimento igual a extensão da transecção e largura igual a duas vezes a faixa de busca do observador (Buckland *et al.*, 2001), é, em média, proporcional a densidade de indivíduos em toda a área de estudo, desde que as transecções sejam alocadas de forma a proporcionar uma probabilidade de cobertura uniforme (ou seja o número de km voados por unidade de área seja constante).

A aeronave utilizada como plataforma de observação deverá ser um Aerocommander 500B, bimotor, com asa alta, janelas-bolha (observadores da frente) ou equivalente. Durante os transectos de observação, a aeronave deverá voar a uma altitude constante de 500 pés (150m) e velocidade entre 170-190 km/h. Os dados deverão ser coletados utilizando um protocolo semelhante aos previamente aplicados para a obtenção de estimativas de abundância de toninhas na FMA I, FMA II e FMA III (Zerbini *et al.*, 2010; Danilewicz *et al.*, 2010; Danilewicz *et al.*, 2012).

Para a busca, contagem e identificação de grupos deverá ser utilizada uma equipe de quatro pesquisadores em cada sobrevoo. Dois observadores posicionados na frente (janelas-bolha) e dois atrás (janelas-plana) deverão trabalhar simultaneamente e de forma independente, não havendo comunicação (acústica ou visual) entre eles durante o esforço de observação. Para os sobrevoos dedicados a avaliação de pequenos mamíferos e tartarugas, a equipe deverá ser formada por observadores com experiência prévia de monitoramentos aéreos. Apesar da experiência prévia da equipe, um sobrevoo de treinamento antes do início dos trabalhos deverá ser realizado para calibração e padronização entre os pesquisadores.

O observador deverá varrer uma área entre os 90° e os 30° de declinação em relação ao horizonte, empregando um maior esforço de observação próximo aos 90° . Em relação ao rumo do avião, o observador não deverá buscar grupos após os 90° (considerando o rumo do avião = 0°). Cada observador deverá ser responsável pela coleta das condições ambientais, possíveis co-variáveis que afetem a probabilidade de detecção, sendo tomadas no início de cada transecto e a cada vez que uma mudança significativa ocorrer. Deverão ser registrados (1) estado do mar em escala Beaufort, (2) reflexo no campo de visão - porcentagem e intensidade, (3) transparência da água - registrada visualmente como "turva" ou "clara", e (4) visibilidade. A visibilidade deverá ser elencada subjetivamente como "excelente", "boa", "moderada" e "ruim" de acordo com a escala fornecida por Rugh *et al.* (1993). Essas variáveis influenciam a detectabilidade de mamíferos marinhos e deverão ser adicionadas nos modelos de densidade (Marques & Buckland, 2003).

Para cada detecção deverá ser registrado a hora, a espécie, o tamanho do grupo, presença de filhotes e o ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo detectado. Caso não seja possível determinar a espécie de mamífero marinho no momento da detecção e/ou tamanho do grupo, o esforço de observação poderá ser encerrado para realizar o registro fotográfico do grupo para posterior análise em laboratório. Este procedimento deverá ser avaliado caso a caso pelo coordenador do voo, levando em consideração tempo de voo, características da detecção e relevância para o escopo do estudo aqui proposto. O ângulo de declinação entre o horizonte e o grupo avistado deverá ser coletado pelo observador com o auxílio de um inclinômetro assim que o grupo estiver perpendicular ao observador. A partir deste ângulo e da altitude da aeronave deverá ser calculada a distância perpendicular entre o grupo detectado e o transecto percorrido pelo avião. Os relógios dos observadores (fixados em posição junto a janela, para facilitar a visualização da hora) deverão estar perfeitamente sincronizados com o horário do GPS, o qual deve gravar uma posição lat/long a cada 3 segundos. Todas as informações deverão ser registradas em gravadores digitais individuais e georreferenciadas com base na hora do registro.

Ao longo do projeto, serão realizados um monitoramento anual para pequenos cetáceos e tartarugas e um monitoramento anual para grandes baleias. O monitoramento aéreo para pequenos cetáceos e tartarugas será realizado durante 45 dias no verão/início de outono. Será empregado um total de 60 horas de voo, incluindo esforço de observação e deslocamento da aeronave. O monitoramento destinado às baleias será realizado no inverno/início de primavera a fim de contemplar a sazonalidade de ocorrência deste grupo na região. O trabalho de campo será realizado em 60 dias e será empregado um total de 120 horas de voo, incluindo esforço de observação e deslocamento da aeronave. É importante notar que o registro e contagem de cetáceos e tartarugas a partir de aeronave é sensível ao estado do mar, devendo ser realizado apenas em condições meteorológicas (vento e chuva) apropriadas a fim de minimizar a perda de animais pelos

observadores. Neste sentido, parte dos dias alocados para o trabalho de campo deverão ser de espera por condições meteorológicas favoráveis pela equipe de observadores.

Para avaliar a densidade de mamíferos, a probabilidade de detecção será estimada utilizando os métodos de amostragem por distância convencional (CDS) e com multivariáveis (MCDS) (Buckland *et al.*, 2001; Marques & Buckland, 2003). Serão propostos os modelos "*half normal*" e "*hazard rate*" sem e com covariáveis para modelar as distâncias perpendiculares. O modelo com maior suporte será selecionado com base no Critério de Informação de Akaike (AIC). A densidade de indivíduos será estimada utilizando o estimador Horvitz-Thompson (Marques & Buckland, 2003).

Para avaliar a distribuição espacial das espécies, deverão ser utilizados os modelos de estimativa superficial da densidade (DSM) (Miller *et al.* 2013). Dados referentes as avistagens, transecções realizadas, informações geofísicas e de sensoriamento remoto serão importados para o programa ESRI ArcMap/ArcGIS® e será produzida uma série de camadas georreferenciadas. *Grids* serão sobrepostos as camadas georreferenciadas e serão extraídos os valores centrais de cada variável de interesse. A relação entre a densidade de animais (variável resposta) e as variáveis ambientais (variáveis explanatórias) deverá ser investigada através de modelos de habitat espécie-específicos construídos a partir de modelos aditivos generalizados GAMs. GAMs oferecem uma abordagem flexível e robusta para a exploração e caracterização de dados complexos, relações não lineares entre variáveis, e são largamente utilizados na modelagem de habitat de mamíferos e tartarugas marinhas.

A análise de dados será realizada através do uso do programa R utilizando os pacotes "mrds", "dsm", e "mgcv". A produção de mapas de distribuição espacial, assim como de outras figuras georreferenciadas, será feita com o uso do programa ESRI ArcMap/ArcGIS®.

No monitoramento aéreo deverá ser realizada a avaliação dos dados populacionais anteriores das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) e baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*) com o objetivo de comparar quantitativamente as populações antes e após o evento e identificar possíveis locais de afastamento dos animais.

Os monitoramentos deverão ser associados aos estudos comportamentais dos cetáceos no local ou na área em que se deslocaram. No caso do deslocamento dos cetáceos para outras áreas, além dos estudos propostos, verificar a disponibilidade de alimentação no local.

Metodologia para gravação acústica passiva de cetáceos

A aplicação dessa nova ferramenta de acústica passiva possibilitará descrever e avaliar os padrões de vocalização e ecolocalização do grupo na foz do Rio Doce, plataforma continental e áreas protegidas adjacentes, ajudando na compreensão do uso ou não dessas áreas pelos animais. Deverão ser determinados as atividades e o uso da área pelos animais, através da interpretação de seus sinais sonoros (taxa e períodos de emissão das vocalizações e dos sons de ecolocalização). Deverão ser avaliadas as características físico-químicas do ambiente que possuem maior influência sobre os parâmetros de frequência e intensidade de sons modulados e pulsados dos cetáceos sob diferentes escalas de variação espacial na região através de um delineamento amostral hierárquico.

O monitoramento acústico passivo (*Passive Acoustic Monitoring* - PAM) vem sendo cada vez mais utilizado pela comunidade científica para o estudo e levantamento de mamíferos marinhos, especialmente cetáceos, alguns dos quais estão mais disponíveis acústica que visualmente. Conduzido isoladamente ou em conjunto com o monitoramento visual (e.g. amostragem por transecções lineares), devido aos avanços recentes no processamento de sinais e na capacidade global de detecção, o método acústico fornece novas ferramentas para levantamento populacional. Portanto, é possível a obtenção de resultados de estimação de abundância confiáveis já que tendem a aumentar a probabilidade de detectar os indivíduos).

No Brasil esse método vem sendo empregado para levantamento de diversas espécies de cetáceos desde 2012 e o conhecimento estabelecido em nosso laboratório sobre acústica de toninha garante que o uso de sistema de monitoramento acústico é adequado à espécie atenderá plenamente os objetivos propostos.

Cruzeiros

Serão realizados uma campanha de campo com duração de 90 dias. O estudo será conduzido ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. Cada etapa será composta por cruzeiros de 5-10 dias de navegação com intervalo para descanso da equipe. Será utilizada uma embarcação de baixo ruído, permitindo a aproximação dos cetáceos com mínimo efeito de alteração comportamental.

Coleta de dados

Para a coleta dos dados acústicos durante os cruzeiros será usada um cabo de 80 metros de

comprimento composto por uma matriz de 3 elementos de hidrofones omnidirecionais distantes dois e um metro entre si e dispostos a um metro a partir da extremidade do cabo (para manter a estabilidade do sistema). Os sinais acústicos são coletados de forma contínua durante o período de amostragem. Os sinais registrados pelos hidrofones (três canais) são transmitidos a uma placa digitalizadora (modelo *Iotech-Personal Daq/3000 Series*) com frequência de amostragem de 400kHz/24 bits e resposta de frequência até 200kHz e posteriormente gravados em um computador portátil e automaticamente salvo como arquivos de segurança em HD externo.

Processamento e análise dos dados acústicos:

Para detecção dos cliques de ecolocalização de cetáceos (ANDRIOLO et al. 2014) serão utilizados três detectores já disponíveis na literatura: (1) Trial 2 (Software PAMGuard); (2) Xbat (YACK et al., 2009); e (3) Triton (os dois últimos através do Software MATLAB). Para cada detecção registrada nos arquivos de som analisados serão determinados o tempo inicial e final e duração das detecções. Amostras de falso-positivo e falso-negativo serão conduzidas para avaliar a ocorrência de possíveis erros associados à detecção. Para isso, um minuto a cada 10 minutos dos arquivos de som analisados serão visualmente inspecionados através de espectrogramas, gerado pelo software Raven Pro 1.5 ou Triton, dependendo da qualidade do gráfico gerado. Os resultados relacionados aos números de detecções, falso-positivos e falso-negativos gerados por detector serão comparados estatisticamente avaliando, assim, qual detector melhor se ajusta ao banco de dados de sinais acústicos de toninha analisado.

Análises específicas

Será considerado um bloco de detecção a ocorrência consecutiva de sinais acústicos específicos da espécie com intervalo menor igual a 5 minutos. A partir de 5 minutos com ausência de sinais será considerado um outro bloco de detecção.

Dados acústicos e comportamentais serão coletados a partir de uma embarcação adequada para a atividade. Serão realizadas gravações sincrônicas de vídeo e áudio e também gravações de áudio independentes. Imagens serão gravadas a partir de uma câmera de vídeo portátil conectada a um hidrofone e a um microfone. Gravações de sons independentes deverão ser realizadas com hidrofone e um gravador de estado sólido portátil. Após a avistagem, a aproximação ao grupo de cetáceos deverá ser realizada.

Serão tomadas todas as providências para que os animais não se sintam demasiadamente perturbados ou encurralados pela proximidade do barco. As gravações serão iniciadas após o desligamento completo do motor da embarcação, caso esta esteja em uso. A distância mínima do grupo para o início dos procedimentos deverá ser de 500m. Juntamente com as gravações de imagem e som serão coletados dados de caráter ambiental tal qual temperatura da água, direção do vento, existência de correntes no local da gravação e profundidade.

A composição do grupo, tipo e o comportamento serão descritos. Categorias comportamentais serão estabelecidas de acordo com os etogramas empregados para a espécie.

Para assegurar que os sons gravados estão de fato sendo produzidos pelo grupo focal deverá ser utilizado para a determinação do ângulo de origem do som, um arranjo de hidrofones de 3 unidades que deverá ser rebocado pela embarcação. A distância dos animais e sua angulação em relação ao azimute da embarcação serão determinadas por um laser finder e uma bússola. Se determinado que os animais estão muito próximos da embarcação, se estiverem apresentando sinais de stress devido a aproximação do barco ou se o grupo iniciar natação constante para longe da embarcação, as observações serão interrompidas e um novo grupo focal deverá ser eleito. Para tal, as rotas serão aleatórias, até que os animais sejam encontrados.

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

O indivíduo que emitir o sinal vocal terá, além da sua vocalização, seu comportamento registrado pela câmera (adaptado de Dudzinski et al., 1995). Paralelamente, outro membro da equipe deverá registrar em planilha de campo dados ambientais, tomados a cada hora. Seguindo a técnica de amostragem de grupo-focal (ALTMANN, 1974) informações sobre a composição do grupo, comportamento aéreo dos golfinhos, localização geográfica do grupo e tempo de permanência na área, deverão ser registrados a intervalos de 5 minutos.

As análises das emissões sonoras deverão ser feitas utilizando o programa Raven Pro 1.3 ou similar,

o qual fornece o oscilograma e o sonograma e do software Adobe Premier 7 ou similar, que mostrará a gravação da imagem em tempo sincronizado com o oscilograma da trilha sonora gravada, procurando relacionar a vocalização emitida com o comportamento. As emissões sonoras deverão ser classificadas inicialmente em cliques, sons pulsantes ou assovios. Os assovios deverão ser classificados em tipos, conforme a similaridade de seus contornos.

Associações com habitats e tendências de agregação (Objetivo 2)

Para a realização dos estudos de associação com micro-habitats, tendências de agregação e deslocamento serão utilizadas observações diretas a partir de ponto fixo, embarcado e com o uso de veículo não tripulados (VANT ou Drone).

Para as observações feitas com VANTs ou drones, serão utilizados equipamentos como o Phantom IV - Professional, da fabricante chinesa Dji ou equivalente. O Drone é dotado de GPS, sistemas de estabilização de imagem, sensores para evitar colisões e tem sinal de rádio que permite que o aparelho voe a uma distância de até 5km do controle remoto. Caso ocorra perda de link de comunicação com o controle remoto, o Drone retorna automaticamente para o local de partida sem necessidade de intervenção do operador até que o link seja reestabelecido.

O Drone pode realizar voos de até 28 minutos com cada carga de bateria. Porém serão adquiridas quatro baterias extras, resultando na possibilidade de sessões ininterruptas de observações. Pode operar em condições de vento de até 36km/h, o que permite sua utilização durante todo o ano na maior parte do litoral do Brasil.

Para cada operação do Drone será obtido 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.

Após testes operacionais e treinamento de equipe para o manuseio do equipamento, serão feitas aferições de equivalência entre o tamanho dos pixels registrados nas filmagens e fotos e distância real em diversas altitudes. Dessa forma, os organismos identificados dentro do campo de visão, bem como suas estruturas (escudos pré-frontais por exemplo) poderão ser medidas e identificadas. Com isso, acredita-se ser possível realizar foto-identificações de tartarugas marinhas a partir da distinção dos escudos cefálicos, tal como é realizado rotineiramente com as nadadeiras de mamíferos marinhos (Dunbar et al., 2014).

As campanhas de coletas de imagens e filmes serão realizadas em diversos pontos do litoral do Espírito Santo seguindo padrões metodológicos conhecidos de busca e varredura (Bevan et al., 2016) ou localizados durante as estimativas de abundância com censos aéreos. Ao encontrar um alvo de observação, o organismo ou grupo será registrado de forma a se determinar a espécie, tamanho, direção e velocidade de deslocamento, ritmo de mergulho, tamanho do grupo, número de juvenis e adultos, comportamentos de alimentação, deslocamento, interações intra e inter-específicas, dentre outros, sendo que ao redor da foz serão realizadas campanhas mensais de dois dias de duração. Observações extras serão realizadas quando forem detectadas agregações nos censos aéreos tripulados, sendo estimadas seis novas campanhas anuais associadas a estes censos aéreos.

Uma vez detectadas agregações ou identificadas uma relação de determinada espécie com uma área, serão feitas campanhas de mapeamento e identificação dos micro-habitats com o auxílio de um ROV, Veículo remotamente operado (Smolowitz et al. 2015). O equipamento a ser utilizado poderá ser um micro-rov da marca Video-Ray ou equivalente. Devido a seu pequeno peso e baixas exigências em relação a energia este equipamento tem uma configuração ideal para permitir a realização de campanhas de curta duração para identificar e mapear micro-habitats. São previstas duas campanhas anuais para a realização desse mapeamento e identificação, sendo que as campanhas terão a duração de 10 dias cada.

As informações georeferenciadas das ocorrências de espécies e micro-habitats, direções e velocidade de deslocamento dos organismos detectados serão compiladas em um SIG (Sistema de Informações Geográficas). Essas informações serão submetidas a diversos tipos de algoritmos ecológicos de análise de distribuição espacial, bem como análises visuais e de interpolação e análises estatísticas tradicionais de forma a definir níveis de abundância das espécies observadas e suas variações no tempo, padrões de associação com habitats e sua variação no tempo e tendências de deslocamento e suas variações temporais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. Behaviour, n.49, p. 227-267. 1974.
BEVAN, ELIZABETH, THANE WIBBELS, ERICA NAVARRO, MANUEL ROSAS, BLANCA M. Z. NAJERA, LAURA SARTI, FRANCISCO ILLESCAS, JAVIER MONTANO, LUIS J. PEÑA AND PATRICK BURCHFIELD.

- Using unmanned aerial vehicle (UAV) technology for locating, identifying, and monitoring courtship and mating behavior in the Green Turtle (*Chelonia mydas*). *Herpetological Review* 47 (1): 27-32, 2016.
- BUCKLAND, S.T.; et al. 2001. Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations. 448 p. ISBN: 9780198509271
- DANILEWICZ, D.; MORENO, I.B.; OTT, P.H.; TAVARES, M.; AZEVEDO, A.F.; SECCHI, E.R.; ANDRIOLO, A. Abundance estimate for a threatened population of franciscana dolphins in southern coastal Brazil: uncertainties and management implications. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 90, p. 1659-1666, 2010.
- DANILEWICZ, D.; ZERBINI, A.N.; ANDRIOLO, A.; SECCHI, E.R.; SUCUNZA, F.; FERREIRA, E.; DENUNCIO, P.; FLORES, P.A.C. Abundance and distribution of an isolated population of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in southeastern Brazil: red alert for FMA I? Paper SC/64/SM17 presented to the IWC Scientific Committee. Panama 2012.
- DUDZINDKY KM, CLARK CW, WURSIG B. (1995). A mobile video/acoustic system for simultaneous underwater recording of dolphin interactions. *Aquatic Mammals*, 21 (3): 187-193
- DUNBAR, S.G., ITO, H.E., BAHJRI, K., DEHOM, S., SALINAS, L. Recognition of juvenile hawksbills *Eretmochelys imbricata* through face scale digitization and automated searching. *Endangered Species Research*. 26: 137 – 146, 2014.
- HATCH, L. T., CLARK, C. W., VAN PARIJS, S. M., FRANKEL, A. S., AND PONIRAKIS, D. W. (2012). "Quantifying loss of acoustic communication space for right whales in and around a U.S. National Marine Sanctuary," *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology* 26, 983-994.
- HEINEMANN, D. 1981. A range finder for pelagic bird censusing. *Journal of Wildlife Management* 45 :489-493.
- LAILOLO, P. (2010). "The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation," *Biological Conservation* 143, 1635-1645.
- MARQUES, F.F.C.; BUCKLAND, S.T. Incorporating covariates into standard line transect analyses. *Biometrics*, v. 59, p. 924-935, 2003.
- MARQUES, T. A., THOMAS, L., MARTIN, S. W., MELLINGER, D. K., WARD, J. A., MORETTI, D. J., HARRIS, D., AND TYACK, P. L. (2013). "Estimating animal population density using passive acoustics," *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 88, 287-309.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2014. Lista Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Portaria No. 444, de 17 de dezembro de 2014.
- RUGH, D.J., BREIWICK, J.M., DAHLHEIM, M.E. AND BOUCHER, G.C. 1993. A comparison of independent, concurrent sighting records from a shore-based count of gray whales. *Wildl. Soc. Bull.* 21(4): 427-37.
- SMOLOWITZ RJ, PATEL SH, HAAS HL, MILLER SA. Using a remotely operated vehicle (ROV) to observe loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) behavior on foraging grounds off the mid-Atlantic United States. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 471: 84-91, 2015.
- VAN PARIJS, S. M., CLARK, C. W., SOUSA-LIMA, R. S., PARKS, S. E., RANKIN, S., RISCH, D., AND VAN OPZEELAND, I. C. (2009). "Management and research applications of real-time and archival passive acoustic sensors over varying temporal and spatial scales," *Marine Ecology Progress Series* 395, 21-36.
- ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; DANILEWICZ, D.; ANDRIOLO, A.; LAAKE, J.L.; AZEVEDO, A.F. Abundance and distribution of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the Franciscana Management Area II (southeastern and southern Brazil). Paper SC/62/SM7 presented to the IWC Scientific Committee. Agadir, Morocco: 14p. 2010.

**MONITORAMENTO DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS
ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE, PLATAFORMA CONTINENTAL E ÁREAS
PROTEGIDAS ADJACENTES (ANEXO 6)**

SUB-PROJETO: AVES

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Dr. Leandro Bugoni	Coordenador geral do Sub-projeto Aves	FURG
Dr. Márcio Amorim Efe	Amostragens em abrolhos para coleta de dados de rastreamento e amostras biológicas.	UFAL
Dr. Guilherme Tavares Nunes	Responsável pela administração da equipe, análise de dados genéticos e de ecologia trófica	UFRGS
Profissional Mestre II	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Mestre II	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Mestre II	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Júnior	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Júnior	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Profissional Júnior	Pesquisador	FURG-Abrolhos
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Pós-Doutorado	Pesquisador	FURG
Iniciação Científica	Pesquisador	FURG - aves marinhas
Iniciação Científica	Pesquisador	FURG - aves marinhas
Iniciação Científica	Pesquisador	FURG - aves marinhas

2. ESCOPO

Monitoramento ambiental dos impactos causados pelo desastre ocorrido em Mariana (MG). O monitoramento em campo será semestral englobando diferentes espécies de aves em Abrolhos, região costeira, marinha, estuário e manguezal na Foz do Rio Doce. Amostras de sangue, penas e alimento das aves serão coletadas para análises de metais e ade isótopos estáveis; espécies selecionadas serão rastreadas com equipamentos e será feita análise genéticas de populações de aves, com ênfase em espécies ameaçadas de extinção. As aves serão amostradas em 5 áreas: estuarina, manguezais, costeira e marinhas (a bordo e em Abrolhos). nas áreas descritas acima após capturas com redes de neblina, puçá e tarrafa, dependendo do local e espécie. Amostragens de potenciais presas serão realizadas a partir de regurgitados espontâneos durante o manuseio. As metodologias para as amostragens e as análises mencionadas acima estão descritas no Anexo 6 do TR 4.

3. OBJETIVO

Monitorar dos parâmetros biológicos e ambientais das aves ou associados a estas, em cumprimento ao Anexo 6 do Termo de Referência nº 04/2016 – Monitoramento de Mamíferos, Tartarugas e Aves Marinhas, bem como Deliberações, Notas Técnicas e Pareceres relacionados. Neste contexto o presente projeto engloba os seguintes objetivos, conforme TR mencionado:

- 1) Avaliar e monitorar, por uns 12 meses a distribuição, abundância e área de vida das aves marinhas em áreas potencialmente impactadas adjacentes à foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas próximas, incluindo unidades de conservação da região.

- 2) Determinar e monitorar por 12 meses, associação das aves com microhabitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 3) Monitorar, por 12 meses, os encalhes de aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível causa *mortis* e obter amostras biológicas.
- 4) Descrever, a partir de análises moleculares, a prevalência de patógenos das aves *Sula leucogaster*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Phaethon aethereus* na área de estudo para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações ameaçadas ou biomonitoras.
- 5) Monitorar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações espécies de aves marinhas selecionadas, com foco nas que se reproduzem em Abrolhos, ameaçadas de extinção e/ou com forrageamento costeiro.
- 6) Monitorar a evolução das dosagens de metais em tecidos de aves marinhas em encalhes e de aves marinhas vivas na área de estudo.
- 7) Descrever a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis das aves marinhas de espécies-chave.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Determinar as áreas de vida, associações com características ambientais e forrageamento de aves durante o período reprodutivo.

Definição dos modelos de aparelhos para rastreamento e da época de reprodução de cada espécie; Colocação dos rastreadores e obtenção dos dados; Obtenção de dados oceanográficos e fisiográficos em plataformas online e boias; Análise dos dados de rastreamento prévias ao evento; Análise descritiva dos dados de rastreamento. Serão rastreados 20 indivíduos de cada uma das espécies *Sula leucogaster*, *Phaethon aethereus* e *Pterodroma arminjoniana*.

Meta 2- Determinar as áreas de vida, associações com características ambientais e forrageamento de aves durante o período não-reprodutivo

Colocação dos rastreadores nas aves; Recuperação dos rastreadores ou dados; Obtenção de dados oceanográficos e fisiográficos em plataformas online e boias; Análise descritiva dos dados de rastreamento.

Meta 3- Determinar parâmetros reprodutivos e demográficos das aves

Realização de censos de indivíduos ou ninhos nos locais de reprodução. A execução deste acompanhamento é função da necessidade de inferir o momento adequado para a realização do rastreamento ou a remoção de equipamentos colocados previamente nas aves;

Meta 4- Determinar a distribuição e abundância de aves marinhas no mar

Realização de cruzeiros para contagem das aves; Análise dos dados de abundância e distribuição espacial;

Meta 5- Monitorar os encalhes de aves nas praias do litoral do Espírito Santo

Obtenção de dados de encalhes de aves nas praias adjacentes à Foz do Rio Doce fornecidos por Programa de Monitoramento de Praias; Análise da abundância relativa das espécies, sazonalmente, e distribuição espacial.

Meta 6- Determinar os padrões sanitários das aves de Abrolhos, Trindade* e praias adjacentes à Foz do Rio Doce

Coleta de amostras de aves nas colônias; Coleta de amostras de aves capturadas a partir de embarcações; Coleta de amostras de tecidos de aves mortas ou debilitadas nas praias; Análise laboratorial de patógenos das amostras; Análise molecular de amostras de aves prévias ao evento; Análise dos dados.

Meta 7- Determinar os parâmetros genéticos das populações de aves

Coleta de amostras de sangue para análise molecular; Sequenciamento das amostras; Análise dos dados para obtenção de parâmetros genético-populacionais.

Meta 8- Determinar os níveis de contaminação por metais nas aves

Coleta de amostras de penas e sangue de aves nas ilhas*, mar e praia; Análise das amostras prévias ao evento; Análise das amostras coletadas; Análise dos dados.

Meta 9- Determinar a ecologia trófica de aves a partir de isótopos estáveis

Coleta de amostras para análise de isótopos estáveis em tecidos de aves nas ilhas*, mar e praia; Análise das amostras prévias ao evento; Análise das amostras coletadas; Análise dos dados.

**Considerando que Pterodroma aminjorniana, uma das espécies-alvo do Anexo 6, se reproduz no Brasil apenas na Ilha da Trindade, existe a possibilidade de termos que fazer coleta na ilha, uma vez que durante parte do período reprodutivo a espécie ocorre na região entre Trindade e a costa brasileira. Entretanto, existe a necessidade de esclarecimento sobre a coleta de dados sobre esta espécie na referida ilha, porque o TR4 aponta para a atuação das equipes de monitoramento na chamada "Área Ambiental I", que não compreenderia, por todas as áreas de estudo apresentadas nos diferentes anexos, pontos na Ilha da Trindade. Desta maneira, esta questão será discutida na reunião de alinhamento a ser realizado no I Workshop Renova-CTBio-FEST em Agosto de 2018.*

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)
Lista de modelos de rastreadores e seus respectivos fabricantes, com detalhe acerca dos custos. Matriz com dados de contagens de ninhos de frequência mensal.	Profs. Leandro, Guilherme e Márcio, Bolsista pós-doc
Lista dos indivíduos rastreados com informações sobre conteúdo e localização do ninho. Matrizes de dados espaciais dos indivíduos rastreados.	Profs. Guilherme e Márcio
Matrizes de dados físicos com médias para os últimos 15 anos e dados atuais referentes ao período do rastreamento.	Prof. Guilherme; Doutor (análise de dados espaciais)
Matrizes de dados de distribuição espacial de aves marinhas obtidos com rastreadores remotos.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Matrizes de dados de distribuição espacial de aves marinhas obtidos com rastreadores remotos.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Matrizes de dados de distribuição espacial de aves marinhas obtidos com rastreadores remotos.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Matrizes de contagens de ninhos com determinação do conteúdo de cada ninho	Profs. Márcio e Guilherme
Matrizes de contagens de ninhos atuais e pretéritas	Profs. Márcio e Guilherme
Matrizes de censos embarcados com localização geográfica das avistagens	Projeto Albatroz, Prof. Leandro
Matrizes de censos embarcados com localização geográfica das avistagens	Projeto Albatroz, Prof. Leandro
Dados de encalhes de aves recebidos de equipes de monitoramento organizados e repassados às instituições	Projeto Albatroz, Prof. Leandro
Lista de números de tombamento das aves em coleções de referência ou bancos de amostras.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro, bolsista responsável pela curadoria
Lista de amostras obtidas em campo para cada espécie	Projeto Albatroz, Profs. Leandro, Márcio, Guilherme

Matriz com patógenos analisados para cada indivíduo amostrados nas colônias, no mar, e na praia.	Projeto Albatroz, Prof. Guilherme
Matriz com sequências moleculares dos microorganismos analisados.	Prof. Guilherme e bolsista geneticista
Matrizes de dados quantitativos e qualitativos dos microorganismos observados	Prof. Projeto Albatroz, Prof. Guilherme
Matrizes de sequências obtidas antes e após o evento.	Prof. Guilherme e bolsista geneticista
Tabela com concentrações dos metais analisados para cada espécie de ave marinha e tecido	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Tabela com razões isotópicas de carbono e nitrogênio para cada indivíduo amostrado	Profs. Leandro e Guilherme; Doutor (especialista em ecologia trófica)

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Análise da fenologia reprodutiva das espécies que se reproduzem em Abrolhos.	Profs. Leandro, Guilherme e Márcio
Mapas com distribuição espacial dos indivíduos rastreados. Análise prévia para verificação do sucesso do rastreamento; cortes das viagens de interesse (forrageamento).	Profs. Guilherme e Márcio
Sobreposição dos dados com os trajetos realizados pelas aves marinhas para identificar potenciais influências do ambiente físico sobre a distribuição espacial das aves.	Prof. Márcio; Doutor (análise de dados espaciais)
Recorte dos diferentes comportamentos ao longo do trajeto e interpolação dos pontos identificados com comportamento de forrageio. Comparação da localização das áreas de alimentação identificadas antes e depois do evento. Comparação dos parâmetros da viagem entre os dados obtidos antes e depois do evento. Sobreposição das viagens com os dados físicos obtidos.	Prof. Guilherme; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Mapas com distribuição espacial dos ninhos dos indivíduos rastreados.	Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático); Prof. Guilherme
Análise prévia para verificação do sucesso do rastreamento; cortes das viagens de interesse (forrageamento).	Doutor (análise de dados espaciais); Prof. Márcio
Identificação de áreas de invernagem e sobreposição com dados físicos obtidos.	Prof. Leandro; Doutor (análise de dados espaciais); Doutor (matemático)
Estimativa do tamanho populacional.	Profs. Márcio e Guilherme
Comparação com dados de contagem de ninhos pretéritos; análise da fenologia reprodutiva de cada espécie que se reproduz em Abrolhos.	Prof. Márcio e Guilherme
Construção de mapas de distribuição da comunidade de aves marinhas que utiliza a Foz do Rio Doce e adjacências, sobrepostos aos dados físicos obtidos para a região.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Mapas dos locais de ocorrência (e densidade das espécies mais abundantes) ao longo das praias amostradas.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Número total de indivíduos por espécie em cada mês de amostragem	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Porcentagem das populações de aves contempladas pela amostragem.	Projeto Albatroz; Prof. Leandro
Quantificação da prevalência de patógenos observados para cada espécie de ave marinha amostrada Em Abrolhos, no mar, ou na praia.	Projeto Albatroz; Prof. Guilherme

Análise da representatividade das populações em relação ao tamanho populacional estimado.	Prof. Guilherme; Mestre (especialista em genética)
Refinamento e alinhamento das sequências	Prof. Guilherme; Mestre (especialista em genética)
Análise de gargalo de garrafa populacional utilizando amostras obtidas antes e depois do evento; cálculo dos índices de variabilidade genética.	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Mapa com distribuição espacial dos pontos de amostragem	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Concentração de Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As nas espécies de aves marinhas que utilizam a área atingida	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Combinação dos resultados de contaminação com as áreas de vida das aves marinhas identificadas por rastreamento remoto	Prof. Leandro; Mestre (experiência em análise de metais)
Análise de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ nas espécies de aves marinhas que utilizam a área atingida	Prof. Leandro; Guilherme; Doutor (especialista em ecologia trófica)
Análise comparativa das razões isotópicas médias e da amplitude dos nichos isotópicos entre amostras obtidas antes e depois do evento	Profs. Leandro e Guilherme; Doutor (especialista em ecologia trófica)

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Meta 1- Para a definição das zonas de forrageamento e comportamento de alimentação das aves de Abrolhos (*Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus*) durante o período reprodutivo, serão utilizados 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 um mês 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 para cada uma das espécies em duas expedições ao longo de um ano, considerando como satisfatório um mínimo de duas viagens de alimentação para cada indivíduo. A partir das matrizes de dados com posição geográfica 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 lineares mistos 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. Dados oceanográficos serão obtidos por imagens de satélite a partir do sistema Aqua MODIS, NASA/GSFC, utilizando o algoritmo Ocean Color Index (OCI), e pelo Programa Nacional de Boias, através da Boia Oceanográfica de Porto Seguro (15.99°S e 37.95°O). Análise

de ondas (wavelet analysis) será utilizada para definir comportamentos das aves marinhas durante viagens de forrageio e calcular orçamentos de tempo e atividade, a partir dos dados de acelerometria.

A equipe coordenada pelo Prof. Dr. Leandro Bugoni possui dados de rastreamento de *Phaethon aethereus* em Abrolhos para os anos de 2011 e 2012, de *Sula leucogaster* em Abrolhos para 2013, e de *Pterodroma arminjoniana* em Trindade para 2014 e 2015, viabilizando comparações de padrões de viagens de alimentação em período reprodutivo antes e depois do desastre ambiental. Diversos equipamentos foram empregados ao longo dos anos e serão utilizados para comparação na presente proposta. Será dada ênfase ao período pré-reprodutivo, quando a espécie desloca-se em direção ao continente, utilizando áreas costeiras sobre a plataforma continental brasileira e Cadeia Vitória-Trindade (Leal et al. 2017).

Meta 2- As aves marinhas serão rastreadas em período não-reprodutivo através de geolocalizadores e PTT's-GPS (do inglês *Platform Transmitter Terminal*). Geolocalizadores são equipamentos de pequeno porte que registram a intensidade de luz em intervalos curtos de tempo (minutos) e possibilitam o cálculo de duas posições diárias (latitude e longitude) aproximadas, por longos períodos. Para determinação das áreas de invernagem de *Sula leucogaster*, *Phaethon aethereus*, e *P. arminjoniana* serão colocados geolocalizadores modelo MK4093 ou equivalentes, com sensores de temperatura e úmido/seco (www.biotrack.co.uk), os quais têm capacidade para registro de dados a cada 5 minutos, durante 2 anos, e possuem massa de 1,5 g, ou seja, abaixo dos 3% da massa corporal das aves, conforme recomendado. As aves serão capturadas no ninho, manualmente, e o equipamento será aderido à anilha colorida com lacre plástico. Após a fixação do aparelho, processo que dura cerca de cinco minutos, a ave será solta onde foi capturada. Quando do retorno das aves no ano seguinte ao de sua marcação, a ave será recapturada no ninho, o equipamento será removido, e os dados descarregados em computador. O equipamento registra ainda imersão na água (sensor úmido/seco), permitindo inferir períodos de voo e de mergulho ou pouso na água, bem como temperatura superficial da água. Estas informações serão um complemento fundamental aos dados oceanográficos e de censos obtidos de aves e cetáceos no âmbito deste projeto. Para determinação das áreas de invernagem de *Thalassarche chlororhynchos* serão utilizados PTT's, cujos transmissores por satélite deverão emitir sinais de rádio captados pelos satélites em órbita terrestre que estão sobre a área no momento em que o sinal é emitido. Os equipamentos deverão ser de tamanho reduzido, fixados no dorso das aves marinhas e, dependendo do modelo, recarregados através de um painel solar. Os dados deverão ser obtidos sem a necessidade de recaptura dos organismos, através de um canal de transmissão de dados alugado junto a empresas como a ARGOS. As análises de distribuição no mar e sobreposição com variáveis oceanográficas seguirá a metodologia descrita na Meta 1.

A equipe coordenada pelo Prof. Dr. Leandro Bugoni possui dados de rastreamento em período não-reprodutivo de *Pterodroma arminjoniana* em Trindade para 2014 e 2015 e de *Thalassarche chlororhynchos* na plataforma continental do sul do Brasil em 2015, viabilizando comparações de interação com variáveis oceanográficas em período não-reprodutivo entre antes e depois do desastre ambiental. Devido à ampla área de uso do oceano por esta espécie o rastreamento em áreas relativamente distantes não deverá ser um impeditivo para comparações pré/pós desastre.

Meta 3- Serão realizadas buscas ativas de ninhos e contagens diretas de indivíduos de *Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus* em Abrolhos, e *Pterodroma arminjoniana* em Trindade* durante o período reprodutivo, incluindo contagens de aves em voo em áreas de referência para *P. arminjoniana*, conforme protocolo de monitoramento definido pelo PLANACAP. Os ninhos encontrados serão identificados e georeferenciados. A definição do tempo de incubação será obtida através do acompanhamento dos ninhos ao longo de uma temporada reprodutiva, desde a postura até o nascimento dos filhotes. Individualização de adultos e filhotes será feita com anilhas metálicas do CEMAVE/ICMBio. Além da individualização das informações sobre cada espécime, o anilhamento permitirá verificar, a partir da captura e recaptura da ave marcada, outras informações como sobrevivência, fidelidade ao ninho e ao parceiro reprodutivo. Além disso, será realizado acompanhamento do período reprodutivo de *Sula leucogaster* e *Phaethon aethereus* em Abrolhos quantificando os ovos postos, ovos eclodidos, filhotes nascidos e filhotes recrutados.

Meta 4- 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 mensais. 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. Pelo menos 7 transecções com 200 km de extensão devem ser elaborados, (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 reconhecida, 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 6 ângulo reto com a rota 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. Os censos deverão ser realizados por dois ornitólogos com experiência, simultaneamente para evitar problemas de detecção de aves durante o deslocamento da embarcação (Spear et al. 2004) e deverá ser auxiliado pelo observador de mamíferos. 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.

Meta 5- A metodologia a ser executada deverá ser o “Itinerário Fixo” (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. 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 as 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). A metodologia deve incluir também o atendimento aos chamados de encalhes de aves nas praias realizados pela comunidade e/ou pelo Projeto de Monitoramento de Praias. Dados qualitativos, 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. As carcaças recolhidas serão tombadas e depositadas na Coleção de Aves da FURG (CAFURG), após identificação, coleta de dados morfométricos e kit histológico, e preparação de pele por taxidermia.

Meta 6- 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 há a disponibilidade de amostras de sangue armazenadas destes locais (Abrolhos e Trindade), que podem nos trazer um diagnóstico pré-acidente, ressalta-se a iminente necessidade de avaliar aves de interesse como biomonitoras quanto ao incremento da presença de doenças e prevalência de patógenos devido a fatores imunes e de degradação ambiental que afetem a ecologia parasitas-hospedeiros.

A presente proposta objetiva avaliar a sanidade das aves, com exames hematológicos (pesquisa de hemoparasitas, relação H:L), exames bioquímicos e pesquisa molecular de agentes infecciosos como *Chlamydophila psittaci*, *Paramyxovirus-1* e *Paramyxovirus-2*, *Adenovirus*, *Avipoxvirus* e *Flavivirus*, *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., *Pasteurella* sp., *Borrelia* sp., entre os principais. Para tanto deverão ser obtidas amostras de sangue e suabes de todas as aves que forem manipuladas nas capturas a bordo, em Abrolhos, em Trindade* e no monitoramento de encalhes nas praias. As coletas de sangue deverão ser realizadas por venopunção da veia ulnar ou da jugular. No máximo 1% do peso corporal de sangue de cada ave deverá ser coletado, utilizando agulhas descartáveis acopladas em seringas heparinizadas.

Imediatamente após a coleta do sangue deverá ser realizada uma extensão sanguínea e em seguida o sangue deverá ser transferido para microtubos (tipo Eppendorf), previamente identificados. Após a coleta, os microtubos deverão ser mantidos em caixas refrigeradas para serem encaminhados, sob refrigeração, a laboratórios comerciais e/ou parceiros da Rede Albatroz, criada no âmbito do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis – PANACAP, pelo Projeto Albatroz. As amostras de sangue total deverão ser processadas para realização dos parâmetros hematológicos e extração de DNA. Padrões hematológicos serão obtidos pelos profissionais de medicina veterinária em campo ou até 24-48 h após a colheita das amostras. As amostras de DNA extraídas por kits comerciais, tanto das amostras de sangue quanto das amostras de suabes cloacais e de orofaringe, deverão ser mantidas congeladas a -80°C para posterior utilização nos exames de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético para a identificação do patógeno. As amostras de cloaca e orofaringe para análise microbiológica e PCR deverão ser coletadas das aves utilizando-se suabes estéreis específicos e mantidas refrigeradas em meio de transporte Stuart por até 48 h até processamento no laboratório (cultura e isolamento das bactérias para posterior extração de DNA e sequenciamento genético). Um segundo suabe de cloaca e orofaringe deverá ser processado diretamente para detecção molecular de patógenos, sendo mantido congelado em tubos tipo plásticos, tipo *ependorf*, contendo meio PBS, antibiótico e antifúngico desde imediatamente após a colheita até análise laboratorial. Estas amostras também poderão ser utilizadas no sequenciamento em massa (metagenômica) para identificação da presença dos patógenos de escolha.

A correlação entre a presença e prevalência dos patógenos em aves e variáveis ambientais poderá ser investigada através de métodos estatísticos tradicionais (e.g. análises de variância, covariância e canônica) ou, alternativamente, utilizando modelos lineares generalizados (GLM) ou modelos aditivos generalizados (GAM). A variação na composição da microbiota e na prevalência de doenças/patógenos de aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas*), por estações do ano, deverá ser verificada através de análises de variância (ANOVA).

Meta 7- As capturas das aves serão realizadas conforme metodologia descrita na Meta 1. Cerca de 300 amostras de sangue das aves de Abrolhos e de Trindade 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 ressuscitado 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.

Para a amplificação por PCR e sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA), cada amostra deverá ser submetida a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com *primers* específicos. Para purificação e sequenciamento dos fragmentos, será utilizada a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos serão submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos. Para a análise das seqüências mitocondriais as mesmas deverão ser alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) por meio do programa MEGA v.6. Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier e Lischer 2010) deverão ser calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA), baseada no FST com 1000 permutações.

A análise de microssatélites seguirá os *primers* e condições de PCR descritos por Humeau et al. (2011) para *Phaethon aethereus*, por Taylor et al. (2010) para *Sula leucogaster*, e por Brown e Jordan (2009) para *Pterodroma arminjoniana*. Os produtos de PCR serão purificados e genotipados. Uma alternativa para a análise de DNA nuclear é o sequenciamento em massa (metagenômica), o qual utiliza uma porção maior do DNA e produz resultados mais acurados. Embora não indicada no Termo de Referência em questão, o rápido desenvolvimento das técnicas de análise molecular, a redução dos custos e os resultados mais precisos, pode 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 H_2O , 2,0 μL MgCl_2 (25 mM), 2,0 μL de dNTPs (10 mM), 2,5 μL de tampão NH_4SO_4 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*, *Pterodroma arminjoniana*, 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://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Valores de P deverão ser considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$). 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.

De posse desses dados, será comparada a variabilidade genética entre as amostras obtidas ao longo da execução da presente proposta, e amostras obtidas previamente ao desastre ambiental no Rio Doce pela equipe do Prof. Dr. Leandro Bugoni. Através dessas comparações, será possível avaliar se a descaracterização do ambiente na Foz do Rio Doce está influenciando no potencial evolutivo e na variabilidade genética das aves marinhas selecionadas, ocorrentes na região. A FURG possui a infraestrutura requerida para o imediato início das análises genéticas (freezer, geladeira, estufa, centrífuga, banho-maria, agitador, termociclador, cuba de eletroforese, jogo de pipetas, autoclave), necessitando apenas de complementação de infraestrutura, devido à elevada e repentina demanda das análises propostas.

Meta 8- Serão analisados os metais/elementos-traço Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As, de amostras de sangue e penas das aves vivas (debilitadas encontradas nas praias, capturadas a bordo das embarcações ou nas ilhas* onde reproduzem). Das aves encontradas mortas durante os monitoramentos de praia, serão realizadas análises de penas e músculo, prioritariamente. Este material deverá ser congelado para posterior análise, ou as carcaças inteiras encaminhadas para necropsia na FURG e preparação das peles e tombamento em coleção científica. As análises das concentrações destes elementos deverão ser realizadas no mesmo laboratório onde serão realizadas as análises de metais em água, zooplâncton, invertebrados e peixes na região. Estes últimos grupos da fauna incluem potenciais presas das aves e, ao usar o mesmo procedimento, comparações entre os grupos serão possíveis, para um melhor entendimento da dinâmica dos elementos contaminantes na região. 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 (HNO_3) 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 partir disso, será possível comparar as concentrações de elementos-traço e metais entre as amostras obtidas ao longo da execução da presente proposta, e amostras obtidas previamente ao desastre ambiental no Rio Doce, pela equipe do Prof. Dr. Leandro Bugoni. Através dessas comparações, será possível dimensionar o real impacto do lançamento de rejeitos de minério na área de ocorrência das aves marinhas. A FURG possui a infraestrutura requerida para o imediato início das análises de contaminantes, necessitando apenas de reposição de materiais de consumo e reagentes. As análises dos contaminantes citados serão realizadas em conjunto com o Prof. Dr. Adalberto Bianchini (FURG).

Meta 9- Para a análise dos isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N , serão coletadas amostras de músculo das aves mortas nas praias e sangue e penas das aves vivas, e músculo das potenciais presas das aves marinhas. 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 Peedee 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.

É importante destacar que a equipe do Prof. Dr. Leandro Bugoni possui análises de relações tróficas de todas as aves marinhas de Abrolhos e Trindade já realizadas em período prévio ao desastre ambiental ocorrida no Rio Doce. Além disso, a FURG possui a infraestrutura necessária para imediato processamento de amostras (freezer, estufa, liofilizador, condensador Soxhlet, balança de precisão) e espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) em fase final de instalação, possibilitando que todo o processo de preparação e análise de amostras seja feito na FURG. Desse modo, serão necessárias apenas reposição de materiais de consumo e reagentes específicos, considerando alguns equipamentos para reposição e para evitar sobrecarga de trabalho nos aparelhos já existentes.

****Considerando que Pterodroma aminjorniana, uma das espécies-alvo do Anexo 6, reproduz no Brasil apenas na Ilha da Trindade, existe a possibilidade de termos que fazer coleta na ilha, uma vez que durante parte do período reprodutivo a espécie ocorre na região entre Trindade e a costa brasileira. Entretanto, existe a necessidade de esclarecimento sobre a coleta de dados sobre esta espécie na referida ilha, porque o TR4 aponta para a atuação das equipes de monitoramento na chamada "Área Ambiental 1", que não compreenderia, por todas as áreas de estudo apresentadas nos diferentes anexos, pontos na Ilha da Trindade. Desta maneira, esta questão será discutida na reunião de alinhamento a ser realizado no I Workshop Renova-CTBio-FEST em Agosto de 2018.***

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Brown R.M., Jordan W.C. 2009. Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology* 150:925-929.
- 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.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Ellison A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters* 7:509-520.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- 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: *Wildlife Disease Association Latin America*. I Wildlife Disease Association Latin America, São Paulo.
- 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.
- Humeau L., Silva D., Jaquemet S., Requier J.-B., Le Corre M. 2011. Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci in the White-tailed Tropicbird (*Phaethon lepturus*) (Phaethontidae). In *Permanent Genetic Resources Note* (Agostini et al.), *Molecular Ecology Resources* 11:418-421.
- Leal, G.R., Furness, R.W., McGill, R.A.R., Santos, R.A., Bugoni, L. 2017. Feeding and foraging ecology of Trindade petrels *Pterodroma arminjoniana* during the breeding period in the South Atlantic Ocean. *Marine Biology* 164:211.
- Michelot, T., Langrock, R., Patterson T.A. 2016. moveHMM: an R package for the statistical modelling of animal movement data using hidden Markov models. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1308-1315.
- 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 33 free-ranging *Phaethon* tropical pelagic seabirds. In: *Wildlife Disease Association Latin America*. I Wildlife Disease Association Latin America, São Paulo.
- Onley D., Scofield P. 2007. Field guide to the albatrosses, petrels and shearwaters of the world. Christopher Helm Publishers Ltd, London.
- Peterson B.J., Fry B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review on Ecology and Systematics* 18:293-320.

- Post D.M., Layman C.A., Arrington D.A., Takimoto G., Quattrochi J., Montaña C.G. 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152:179-189.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Spear L.B., Ainley D.G., Hardesty B.D., Howell S.N.G., Webb S.W. 2004. Reducing biases affecting at-sea surveys of seabirds: use of multiple observer teams. *Marine Ornithology* 32:147–157.
- 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>.
- 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.
- Taylor S.A., Morris-Pocock J.A., Sun Z., Friesen V.L. 2010. Isolation and characterization of ten microsatellite loci in blue-footed (*Sula nebouxi*) and Peruvian boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151:525-528.

**MONITORAMENTO DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS
ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE, PLATAFORMA CONTINENTAL E ÁREAS
PROTEGIDAS ADJACENTES (ANEXO 6)**

**SUB-PROJETO: “Cetáceos: Genética, Saúde, Dieta, Reprodução,
Uso do habitat e Interação com a pesca”**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Ana Paula Cazerta Farro	Coordenadora parte do Anexo 6	CEUNES/UFES
Leonardo Serafim	Monitoramento das histopatologias e análises bacteriológicas em cetáceos	UENF
José Lailson Brito Jr.	Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos	UERJ
Tatiana Lemos Bisi	Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis	UERJ
Alexandre Azevedo	Estimativa da idade dos cetáceos, maturação e taxa de fecundidade	UERJ
Profissional Sênior	Pesquisador	UENF
Profissional Mestre II	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UENF
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Mestre I	Pesquisador	CEUNES-UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UERJ
Pós-Doutorado	Pesquisador	CEUNES-UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES-UFES
Iniciação Científica	Pesquisador	CEUNES-UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	CEUNES-UFES
Pós-Doutorado	Pesquisador	UENF
Pós-Doutorado	Pesquisador	UERJ

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 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.

Outra informação importante para compreensão dos impactos a que uma população está exposta é a concentração de poluentes, como elementos-traço (Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As), organoclorados (PCBs e pesticidas clorados) e organobromados (PBDEs), pois há evidências de que altas concentrações desses compostos podem causar efeitos deletérios neurológicos, endócrinos, imunológicos e promotores de câncer (Who 1993, Gregory & Cyr 2000, Reijnders 2000, ATSDR 2002). Concentrações de alguns desses poluentes já foram determinadas nas toninhas ao longo da sua distribuição, revelando um quadro preocupante de contaminação (Lailson-Brito et al. 2011, Alonso et al. 2012, Dorneles et al. 2013).

Alguns micropoluentes (e.g. elementos-traço, bifenilas policloradas, difenil éteres polibromados) estão sujeitos ao aumento das suas concentrações ao longo dos níveis tróficos, alcançando concentrações elevadas em organismos topos de cadeia (Renzoni et al. 1998, Gray 2002). O processo de transferência trófica com consequente aumento das concentrações de poluentes nos organismos de um nível trófico para o nível consecutivo pode ser denominado de biomagnificação (Walker et al. 1996). Desta maneira, o estudo das relações tróficas associados às análises ecotoxicológicas de organismos marinhos podem revelar informações importantes sobre a qualidade dos ecossistemas marinhos, assim como contribuir para a compreensão dos processos de bioacumulação e biomagnificação de micropoluentes.

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 desastre no 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. OBJETIVOS

- 1) Monitorar os encalhes de cetáceos nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível causa *mortis*.
- 2) Avaliar e monitorar o uso de mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas adjacentes a foz do Rio Doce (comportamento e uso do habitat), a partir de monitoramento embarcado e por ponto fixo.
- 3) Monitorar a diversidade genética de cetáceos do litoral do ES.
- 4) Avaliar a prevalência de patógenos em cetáceos da área de estudo, para determinar se as alterações ambientais estão afetando o estado de saúde destas populações ameaçadas ou biomonitoras.
- 5) Monitorar a evolução das dosagens de contaminantes e histopatologias em tecidos de cetáceos em encalhes na área de estudo.
- 6) Descrever a ecologia trófica a partir da análise de isótopos estáveis de *S. guianensis* e *P. blainvillei*.

- 7) Estimar a idade dos cetáceos, de sua primeira maturação e analisar a taxa de fecundidade dos cetáceos encontrados mortos nas praias;
- 8) Avaliar a interação dos pequenos cetáceos com a pesca no litoral do ES.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1 – Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo

Atendimento aos chamados de encalhes de cetáceos nas praias realizados pela comunidade e / ou pelo Projeto de Monitoramento de Praias (PMP);

Meta 2 - Monitoramento do uso de cetáceos em áreas adjacentes e foz do Rio Doce

Monitoramento da foz do Rio Doce e áreas adjacentes ou de interesse a partir de pontos fixos e embarques;

Meta 3 - Diversidade genética de cetáceos

Monitoramento da diversidade genética de cetáceos (que tiverem número amostral suficiente), a partir de marcadores moleculares tradicionais.

Meta 4 - Monitoramento das histopatologias e análises bacteriológicas em cetáceos

Monitorar a variação nas prevalências de patógenos e histopatologias associados a área de encalhe mais próximas à foz do Rio Doce ao longo do período de monitoramento e em relação à distância da foz.

Meta 5 - Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis

Descrever a ecologia trófica através de isótopos estáveis.

Meta 6 - Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

Determinação de taxas de contaminantes nos tecidos de animais encontrados mortos ou de animais vivos biopsados;

Meta 7 - Estimativa da idade dos cetáceos, maturação e taxa de fecundidade

Estimar a idade do indivíduo, idade da maturação, estágio reprodutivo e taxa de fecundidade dos animais mortos encontrados.

Meta 8 – Interação dos pequenos cetáceos com a pesca

Obter respostas sobre o tipo de pesca desenvolvido na região, aparato utilizado, captura acidental, frequência, espécie afetada, etc.

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>
Número de visitas as praias. Número de cetáceos atendidos (até 50), com localidade, data, biometria dos animais. Número de necrópsias realizadas. Número de cetáceos removidos (até 50) e destinação. Tipos de tecidos coletados e para que tipo de análise. Laudo com possível causa mortis dos cetáceos necropsiados (até 50).	Instituto ORCA (sul do Rio Doce) e Instituto Baleia Jubarte (norte do Rio Doce)
Localização dos pontos fixos. Tempo de observação em cada ponto; espécies observadas; número e composição de grupos; comportamento realizado.	Ana Paula Cazerta Farro
Localização do percurso realizado no monitoramento embarcado e pontos onde foram realizadas as visualizações dos cetáceos. Pontos de avistagens; tempo de observação em cada ponto de avistagem; espécies observadas; local onde foi observado; número e composição de grupos; comportamento realizado.	Ana Paula Cazerta Farro
Número de tecidos (amostras) que tiveram o DNA extraído e qual a	Ana Paula Cazerta Farro

concentração quantificada para cada amostra; número de amostras amplificadas com sucesso para cada marcador testado; tamanho do fragmento amplificado e após edição. Índices de diversidade genética para cada marcador. Índice de estruturação genética, quando for possível, pois dependerá do número amostral de cada espécie. <i>Com a continuidade do projeto essa análise se torna mais completa.</i>	
Lista com patógenos encontrados em tecidos de até 50 cetáceos, alterações osteológicas e/ou indícios de afecções que podem estar afetando a saúde de cada indivíduo.	Leonardo Serafim
Relação Carbono:Nitrogênio para cada amostra de até 50 cetáceos; Espécies componentes da dieta de até 50 cetáceos.	Tatiana Lemos Bisi
Taxas de micropoluentes, elementos traços, compostos organoclorados e organocromados, e HPAs encontradas nos tecidos de até 50 cetáceos.	José Lailson Brito Jr.
Número de cassetes e lâminas preparadas; idade dos indivíduos, peso das gônadas, caracterização dos ovários.	Alexandre Azevedo
Pontos de desembarque visitados. Número de entrevistas e saídas com pescadores; Faixa etária, principal atividade, tipo de embarcação, etc, dos entrevistados; Principais dados coletados nas entrevistas a respeito da interação pescaXcetáceos; Dados de vestígios de aparatos encontrados em cetáceos mortos.	Instituto Baleia Jubarte

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Avaliação de quais as espécies que mais encalharam, estado de desenvolvimento do animal (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 ORCA e Instituto Baleia Jubarte
Identificação dos locais onde estão ocorrendo cetáceos; caracterização dos grupos e comportamento observados.	Ana Paula Cazerta Farro
Identificação dos locais onde estão ocorrendo cetáceos; caracterização dos grupos e comportamento observados.	Ana Paula Cazerta Farro
Avaliação se a diversidade genética dos cetáceos da região é baixa, pois desta forma, o efeito sobre ela pode ser considerado mais grave. <i>*Com a continuidade será possível verificar se essa diversidade está diminuindo e se existe mais de uma população na região, o que poderia afetar de forma diferente cada uma delas.</i>	Ana Paula Cazerta Farro
Identificação da principal causa mortis dos animais e detecção de patógenos responsáveis pela saúde de cada indivíduo. Verificação de espécie mais afetada, sexo ou estado de desenvolvimento. Discussão sobre quais fatores poderiam estar favorecendo a prevalência de cada patógeno.	Leonardo Serafim
Descrição da ecologia trófica para cada espécie de cetáceo encontrado.	Tatiana Lemos Bisi
Deteção e Identificação de contaminantes que podem afetar a saúde de cada indivíduo. Verificação de espécie mais afetada, sexo ou estado de desenvolvimento. Discussão sobre quais fatores poderiam estar aumentando cada taxa.	José Lailson de Brito Jr.
Determinação da idade, estágio reprodutivo e taxa de fecundidade de até 50 cetáceos encontrados mortos.	Alexandre Azevedo
Avaliação de como é a interação das atividades pesqueiras e os cetáceos na região e se essa foi modificada com a chegada da lama.	Instituto Baleia Jubarte

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

Atendimento de encalhes de cetáceos nas praias do litoral do Espírito Santo

Após o recebimento de informação sobre encalhe de algum cetáceo ou tartaruga marinha nas praias do litoral norte capixaba, prontamente serão realizadas visitas ao local para a obtenção das seguintes informações: condição climática e de maré, localização exata com GPS, identificação da espécie, existência de marcas de aparatos de pesca, registro fotográfico, medições dos animais e coleta de material biológico para análises futuras.

O monitoramento das praias é atualmente realizado no Espírito Santo por uma empresa contratada (CTA), mas que já apresenta parcerias com o Instituto Baleia Jubarte e Organização Consciência Ambiental (ORCA), que após serem chamados realizam o atendimento aos animais nas praias, ou recebem os animais e dados gerais dos encalhes coletados pela empresa.

Quando a equipe de resgate vai até o local, ela avalia a situação. Em se tratando de animal vivo, o médico veterinário realiza os primeiros-socorros e procura orientar o procedimento de devolução do animal para o mar. No caso de se tratar de um animal morto de até 3 metros de comprimento, a carcaça é colocada no carro de resgate e removida para a base de Caravelas (IBJ) ou Guarapari (ORCA). Caso o animal tenha mais de 3 metros, o exame da carcaça e a coleta de material são realizados no local do encalhe.

Os procedimentos de resgate e necrópsia de baleias e golfinhos seguem o Protocolo de Conduta para Encalhes de Mamíferos Aquáticos da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE).

Todos os animais recebem um número de registro. Este mesmo número é utilizado para identificar as amostras biológicas coletadas.

Conforme o estado da carcaça, são coletados dados biométricos e realiza-se a necrópsia, a fim de se estabelecer a causa mortis. Durante as necrópsias, registraram-se os dados biológicos dos exemplares. São levantados dados referentes à classificação taxonômica, comprimento total, peso, medidas alométricas, sexo, estágio de maturação, estado da carcaça e marcas de interação com artefatos de pesca. A carcaça é fotografada, posteriormente descarnada e os ossos coletados e acondicionados para maceração. Amostras de tecidos para análise de DNA também foram coletadas.

Todos os dados coletados são registrados em fichas padronizadas, armazenados em um banco de dados e interpretados. O material osteológico coletado é examinado buscando-se evidências de alterações patológicas. A limpeza do material osteológico é realizada através da técnica de maceração, para posterior tombamento nos acervos do IBJ e do ORCA.

Um fator limitante nesse procedimento é o avançado estado de decomposição no qual muitos animais chegam às praias. O estado de decomposição das carcaças limita o tipo de amostras que podem ser coletadas e o tipo de análises que podem ser realizadas. As carcaças são classificadas seguindo o padrão proposto por Geraci & Lounsbury (2005), em códigos de 1 a 5, onde 1 corresponde ao animal vivo e 5 a restos de esqueleto ou carcaça mumificada.

Monitoramento do uso de cetáceos em áreas adjacentes e foz do Rio Doce

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

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

Quando forem avistados indivíduos serão registrados: espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento, localização exata (GPS), e outras informações que sejam julgadas pertinentes. Estes dados serão inseridos em uma planilha pré-formulada.

Serão considerados parte de um mesmo grupo, os indivíduos que nadarem próximos uns dos outros, com atividades coordenadas, mas não necessariamente deslocando-se na mesma direção (Mann, 2000).

Durante o período serão realizadas observações naturalísticas dos comportamentos utilizando o método de amostragem "Ad Libitum" (Lehner, 1996). Para as observações serão realizados os métodos "animal focal", quando o indivíduo é o foco das observações durante um determinado período, mas não necessariamente o único a ser focalizado pelo período de amostragem, e o de "amostragem sequencial", quando o foco corresponde a uma sequência de comportamentos de um ou mais indivíduos (Lehner, 1996).

Os dados serão agrupados em uma tabela no Excel e para os pontos de coleta serão testadas relações entre a presença e tamanho de grupo e as variáveis: nível de maré (alta, média e baixa); tipo de

maré (enchente e vazante); variação de maré; mês; estação do ano; status comportamental e tempo máximo. Além disso, as relações serão avaliadas para as diferentes áreas.

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

Diversidade genética de cetáceos

Serão utilizadas amostras de músculo ou pele dos cetáceos encontrados encalhados nas praias do Espírito Santo. Outras espécies poderão ser incluídas nas análises dependendo do número de amostras encalhadas no período de estudo.

Os tecidos para as análises genéticas serão armazenados em microtubos e conservados em álcool 70%. Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES (São Mateus), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Extração de DNA e quantificação do DNA: 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. 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.

Amplificação por PCR e sequenciamento: Cada amostra será submetida à PCR (Polymerase Chain Reaction) e reações de sequenciamento e genotipagem para avaliação de marcadores mitocondriais e nucleares (microssatélites).

Purificação e sequenciamento: Após a amplificação dos fragmentos, as reações serão purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos serão submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos. Será feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados.

Análise das sequências mitocondriais: As sequências serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Robert 2004) por meio do programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013).

Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) serão calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações.

As redes de haplótipos serão construídas com cálculos de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999). Será feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Para as análises dos microssatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) e os genótipos dos indivíduos avaliados serão comparados para os locos de microssatélites a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

O desequilíbrio de ligação entre os locos será verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg serão testados por meio do software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010). Os locos também serão testados quanto à presença de alelos nulos, abandono de alelos e erros devido à presença de picos stutter utilizando-se o programa Microchecker v.2.2.0.3 (Van Oosterhout et al. 2004), com correção de Bonferroni.

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

Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de Bottleneck (efeito gargalo) será realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional será 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, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também serão calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001). Valores de P serão considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Sexagem molecular de cetáceos: os animais que não forem recolhidos, mas tiverem uma amostra de tecido recolhida na praia, terão o sexo definido via PCR. Os primers a serem utilizados serão ZFX0582, ZFX0923 (Bérube & Palsboll 1996), PMSRYF (Richard et al. 1994) e TtSRYR (Rosel et al. 2003). Para a sexagem molecular das espécies de ave que não possuem dimorfismo sexual externo será usado o gene

CHD (Fridolfsson e Ellegren, 1999). As reações de PCR serão confeccionadas com: Tampão 10x, 150 μ M de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,3 μ M de cada primer, com exceção do reverse para o SRY que será aplicado 0,06 μ M. O volume final será de 25 μ L. A amplificação será realizada nas seguintes condições: 92°C por 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg e 72°C por 45 segundos. Os fragmentos serão separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética será realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas será realizada com o auxílio de luz UV e estas serão fotografadas.

Análise histopatológica e microbiológica

Após a eutanásia, será realizada necropsia dos cetáceos para colheita de material e avaliação histopatológica no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Durante a necropsia os órgãos serão avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies. Fragmentos de tecidos com até 1 cm de espessura serão colhidos e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada a 10%, excetuando-se o coração, que será colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente para fixação de átrios e ventrículos.

Todo o material será fixado por um período mínimo de 48 horas. Após a fixação dos corações, estes, serão pesados em balança digital de precisão. A seguir todas as amostras serão clivadas em fragmentos menores de até 2-3 mm de espessura e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático (Leica®1 TP1020), onde serão desidratadas em cinco banhos seqüenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. Seguido da clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em seqüência o material será incluído no próprio histossete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos serão resfriados e cortados em seções de 5 μ m de espessura, em micrótomo semi-automático (Leica®1 RM2145). Os cortes serão colocados em banheira histológica, de onde serão coletados por lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica. Ainda, outras histotécnicas especiais poderão ser empregadas, para posterior observação pela microscopia óptica e análise de imagens com auxílio de um programa de morfometria digital (Software Image J, versão 1.33).

As fotomicrografias obtidas serão documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital Nikon®² Coolpix 995, adaptada em microscópio óptico.

Para a microbiologia, no laboratório, as amostras serão semeadas e processadas em meios de cultura (caldos e/ou em agar), como agar sangue, agar macconkey, agar saboraud, agar mueller hinton, entre outros, para o crescimento de micro-organismos patogênicos. Posteriormente, as amostras serão incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano serão repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. Após esse processo, será feita a identificação microbiana, com a realização de análises por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. A seguir, com os micro-organismos identificados, serão realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas para posterior confecção dos laudos.

Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

Após recolhidas as amostras de tecidos, o material de cetáceos e quelônios será enviado para o Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ, onde serão realizadas as análises de contaminantes.

Determinação e análise de micropoluentes - Mercúrio Total: Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), as amostras frescas, cerca de 0,4g de músculo, 0,2g de fígado e 0,2g de rim, serão atacadas a frio com 1mL de H₂O₂. Após essa etapa será adicionado 5mL de solução sulfonítrica concentrada (H₂SO₄-HNO₃) v/v, passando então ao aquecimento em Banho Maria a 60°C por 2 horas até a solubilização completa da amostra. Os extratos serão resfriados por quinze minutos, sendo adicionado 10mL de KMnO₄ (5%). As amostras retornarão ao banho-maria (60°C) por quinze minutos, e serão resfriadas, repousando por uma noite. No dia seguinte o extrato será reduzido com a adição de 1mL de cloridrato de hidroxilamina (HONH₃) 12%. O extrato final será avolumado com água Milli-Q até 14mL. As leituras serão realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica com gerador de vapor frio (FIMS-400 Perkin Elmer) (Malm et al. 1989; Bastos et al. 1998). A certificação do método de determinação do HgT será

feita por meio de materiais certificados DOLT-2 (fígado de Dogfish) e DORM-3 (músculo de Dogfish) do National Research Council do Canadá. Todas as amostras serão analisadas em duplicata e serão usados brancos analíticos em todas as baterias.

A determinação das concentrações de elementos-traço (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, As) será realizada através de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS), utilizando-se de um espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman, da Analytik Jena. Para tal, uma solução de nitrato de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) será utilizada como modificador químico e, conseqüentemente, adicionada a cada solução a ser analisada. Esta será preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS (Merck No.B9366989 710). O controle de qualidade será efetuado através do uso de materiais certificados de referência do USA National Institute of Standards and Technology e do National Research Council do Canadá).

Para a determinação de compostos organoclorados, as extrações serão realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60mL e balões volumétricos de 125 mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes será hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Será utilizado cerca de 8 g de músculo (peso seco). Serão adicionados às amostras os padrões internos PCB 103 e PCB 198. O volume final será reduzido para prosseguir à etapa de purificação com a adição de H_2SO_4 (Santos-Neto et al., 2014). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria (Azevedo-Silva, 2005; Lailson-Brito, 2007) e as concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os pesticidas e as bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD) Agilent 7890. O hidrogênio será utilizado como gás de arraste e o nitrogênio como gás auxiliar (make up). O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões e brancos de solventes.

Para a determinação de compostos organobromados, as extrações serão realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 125 mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes será hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Será utilizado cerca de 8 g de músculo (peso seco). Serão adicionados às amostras os padrões internos PBDE-181 e PBDE-209. O volume final será reduzido para prosseguir à etapa de purificação. O método utilizado para purificação de amostras será o descrito e validado por Covaci et al. (2002) e Voorspoels et al. (2003). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria (Azevedo-Silva, 2005; Lailson-Brito, 2007) e as concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os PBDEs e MeO-PBDEs serão mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massa (MS) Agilent 7890. O GC operará no modo de ionização química negativa (ECNI). O metano será utilizado como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadropólo e interface serão ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS será utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons $m/z = 79$ e 81 (de tri- a hepta-BDEs) e 484,7/486,7 e 494,7/496,7 (para BDE 209 e 13C-BDE 209, respectivamente) monitorados durante toda a corrida. O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões e brancos de solventes.

A metodologia de análise de HPAs será adaptada e otimizada a partir de procedimento descrito pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, Environmental Protection Agency) e em Barros (2014). Resumidamente, alíquotas das amostras liofilizadas serão pesadas e extraídas em Soxhlet com metanol, seguidas pela reação de saponificação através da adição de hidróxido de potássio. Posteriormente será conduzida uma extração líquido-líquido com hexano, onde a amostra será transferida para um funil de separação, onde será adicionado hexano e através de agitação manual o extrato de hexano separado e recolhido em novo balão. Tal procedimento se repetirá 3 vezes e todo o extrato de hexano recolhido será então reduzido a cerca de 1 mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos serão purificados através do clean up, realizado em colunas de vidro. Ao extrato reduzido em Turbo vap será adicionado o padrão interno, para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs será realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometro de massas (CG/MS, Agilent). Recursos materiais: sistema de produção de água ultra pura da marca Milipore, espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (AAS ZEE nit 650P), da marca Analytik Jena, banho-maria, Espectrômetro de Absorção Atômica com geração de vapor frio (modelo FIMS 400, Perkin Elmer), sistemas de condensadores acoplados a soxhlet, rotoevaporador da marca Marconni, modelo MA-120, Centrífuga modelo 5702, da marca Eppendorf, um miniconcentrador/evaporador de nitrogênio um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS), da marca Agilent Technologies, modelo 5975 C e acoplado ao injetor automático da Agilent Technologies, modelo G4513A; um cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (CG-ECD), da marca Agilent Technologies, modelo 7890, com fonte radioativa de ^{63}Ni , acoplado ao injetor automático da Agilent Technologies, modelo 7683B, além de reagentes (e.g.: hexano, diclorometano, ácido sulfúrico, ácido nítrico, cloridrato de hidroxilamina, entre

outros) padrões internos e padrão cromatográfico, materiais certificados de referência, luvas, vidraria (e.g: bequeres, tubo de ensaio, proveta, pipetas volumétricas, balão volumétrico, entre outros), tubos falcon, micropipetas, funil de separação, colunas grossa e fina, entre outros.

Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis

Essas análises serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ (quelônios e mamíferos).

Para a análise dos isótopos estáveis ^{13}C e ^{15}N , serão retiradas alíquotas de músculo dos cetáceos e das suas presas preferenciais na costa do Espírito Santo. Das aves serão coletados músculos das aves mortas nas praias e sangue das aves vivas. Já existem informações sobre os itens mais frequentes na dieta das principais espécies ocorrentes na região (Di Benedetto et al. 2004, Di Benedetto et al. 2009, Cremer et al. 2012, Lopes et al. 2012, Girundi 2013, Pansard et al. 2010, Rodrigues, 2014). As amostras coletadas serão congeladas e enviadas para a UERJ para análise. Após a secagem a 60°C por 72 h, as amostras serão maceradas até a obtenção de um pó homogêneo. Cerca de 1,5 mg de amostra será pesada em cápsula de estanho. A determinação da composição isotópica dos elementos será feita em um espectrômetro de massa DELTA V Thermo Fisher Scientific 17 acoplado a um analisador elementar para C e N (Flash HT Plus). As razões isotópicas são expressas pela notação delta em partes por mil, de acordo com: $\delta X = [(Ramostra/Rpadrão) - 1] \times 1000$, 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. Serão usados materiais certificados de referência em todas as análises. Devido à presença de lipídio ser variável nos tecidos de animais e por apresentar valores depreciados em ^{13}C em relação a todo o corpo (Peterson & Fry, 1987), será 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, será 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 SIAR (Stable Isotope Analysis in R) (Parnell et al., 2010), no qual os modelos de mistura permitem inferir a composição de dieta a partir de várias fontes potenciais de alimento.

Estimativa da idade dos cetáceos, maturação e taxa de fecundidade

A determinação de idade e análises reprodutivas serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A idade dos odontocetos é estimada a partir da contagem dos grupos de camadas de crescimento (GLGs, Growth Layer Groups), depositados na dentina e/ou cemento do dente desses animais. Porém, no caso das toninhas, os dentes são extremamente pequenos e por isso a oclusão da cavidade pulpar ocorre muito cedo na vida do indivíduo, fazendo com que 10 as camadas de dentina ali depositadas sejam cada vez mais estreitas, dificultando a contagem destas (Botta 2005). Por isso, os exemplares que apresentarem mais que três GLGs na dentina, terão sua idade estimada a partir das GLGs do cemento; cada GLG corresponde a um ano de vida das toninhas. A determinação da idade será realizada de acordo com o protocolo estabelecido por PINEDO & HOHN (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo serão colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, serão realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, com cerca de 25 micrometros em um micrótomo de deslizamento acoplado a um sistema de congelamento. Em seguida, os cortes provenientes da porção central do dente serão colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados serão colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lamínula e selados com Entellan. As leituras serão realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas serão coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente, serão fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Um fragmento da região central do testículo contendo 1 cm³ será emblocado em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos serão seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções serão coradas com hematoxilina-eosina para a confecção das lâminas permanentes. As leituras serão realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade será avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos. Além disso, o diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial também serão avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn et al. 1985). Os ovários serão inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, serão realizadas secções de 3 mm para visualizar o interior do

ovário e certificar de que todos os corpora e folículos resultantes da ovulação foram registrados. A determinação da maturidade sexual será baseada em Perrin & Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans serão consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpora lúteo ou albicans em um ovário serão consideradas maduras.

Interação dos pequenos cetáceos com a pesca

Serão realizadas entrevistas, saídas com pescadores e avaliados vestígios de aparato de pesca nos animais encontrados mortos.

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

Após a fase de levantamento preliminar iniciar-se-á a aplicação de um questionário pré-formulado Felix (2011) para os mestres das embarcações onde serão coletadas informações acerca do perfil dos pescadores e locais em que atuam, características da embarcação (dimensões, tripulação e autonomia), artefatos e técnicas utilizadas, etc. Embora o questionário seja elaborado de forma a permitir a tabulação e análise dos dados, as entrevistas serão conduzidas de forma informal, através de um diálogo entre os agentes de campo e os mestres das embarcações, podendo este diálogo ser interrompido e retomado em outro momento até que toda a informação necessária seja coletada. Estes diálogos poderão ser gravados ou não, dependendo da anuência do entrevistado. Nesta etapa quando autorizado, serão fotografados os tipos de embarcação e apetrechos de pesca utilizados.

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

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

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDELT, H.J.; Foster, P.; Rohl, A. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p 37-48, 1999.

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

BÉRUBÉ, M.; PASBØLL, P. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, v. 5, n. 2, p. 283-287, 1996.

BOTTA, S. *Reprodução e crescimento dos machos de toninha (Pontoporia blainvillei) do Rio Grande do Sul, Brasil*. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

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

COVACI, A.; KOPPEN, G.; Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50–65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. *Chemosphere*, v. 48, p.827-832, 2002.

CREMER M. J., PINHEIRO, P. C., SIMOES-LOPES, P. C., 2012. Prey consumed by Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) and franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine environment in southern Brazil. *Iheringia (Série Zoologia)*, 102 (2), 131-137.

DI BENEDITTO, A. P. M., RAMOS, R. M. A., 2004. Biology of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 4, 1245–1250.

- DI BENEDITTO, A. P. M., SANTOS, M. V. B., VIDAL, JR M. V., 2009. Comparison between the diet of two dolphins from south-eastern Brazil: proximate-composition and caloric value of prey species. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 89, 903-905.
- ELLISON, A.M. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters* 7:509–520.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FÉLIX, G.B.V. *Ocorrência e captura acidental de golfinhos no extremo norte do litoral do Espírito Santo*. 2011. 54 p. Dissertação de monografia em Ciências Biológicas Bacharel, Universidade Federal do Espírito Santo – CEUNES. 2011.
- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press*, 2002.
- FRIDOLFSSON AK, ELLEGREN H (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116–121.
- GIRUNDI, I. S., *Dieta de Sotalia guianensis (VAN BÉNÉDEN, 1864) (Cetácea, Delphinidae), no estado do Espírito Santo, Brasil*. Monografia de graduação. Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.
- GOUDET, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.
- 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.
- KALINOWSKI, S.; TAPER, M.; MARSHALL, T. Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 1099–1106, 2007.
- LAILSON-BRITO, J.; DORNELES, P.R.; AZEVEDO-SILVA, C.E.; AZEVEDO, A.F.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C.; VIDAL, L.; MALM, O.; TORRES, J. PCB, DDT and HCB in blubber of franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from southeastern brazilian coast. *Organohalogen Compounds*, v. 69, p. 1748-1750, 2007.
- LEHNER, P. N. Handbook of ethological methods. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 672 p.
- LOPES, X. M., SILVA, E., BASSOI, M., SANTOS, R. A.; SANTOS, M. C. O. Feeding habits of Guiana dolphins, *Sotalia guianensis*, from southeastern Brazil: new items and a knowledge review. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 92, 1723-1733, 2012.
- MANN, J. 2000. Unraveling the dynamics of social life, p. 45-64. In: J. MANN; R.C. CONNOR; P.L. TYACK & H. WHITEHEAD (Eds). *Cetacean society – field studies of*
- PANSARD K. C. A., GURGEL H. C. B., ANDRADE L. D. A., YAMAMOTO M. E. Feeding ecology of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) on the coast of the Rio Grande do Norte, Brazil. *Mar. Mamm. Sci.* 27, 673-687, 2010.
- PARNELL, A.C., INGER, R., BEARHOP, S. & JACKSON, A.L. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS ONE* 5:e9672.
- PERRIN, W. F.; G. P. DONOVAN. Habitat use patterns of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off southern Brazil in relation to water depth. 1984.
- 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.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, n. 155, p. 945-959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248-249, 1995.

RICHARD, KR.; MCCARREY, SW.; WRIGHT, JM.; DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Canadian Journal of Zoology*, v. 72, p. 873-877, 1994.

ROBERT, CE. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources*, v. 32(5), p. 1792-1797, 2004.

RODRIGUES, V. L. A., *Dieta e ecologia alimentar do boto-cinza, Sotalia guianensis (Cetartiodactyla: Delphinidae), na região do Banco dos Abrolhos, costa central do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Oceanografia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

ROSEL, P.E. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation Genetics*, v.4, p. 647-649, 2003.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 103-106, 2008.

TAMURA, K ET AL. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 535-538, 2004.

VOORSPOELS, S.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Polybrominated Diphenyl Ethers in Marine Species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: Levels, Profiles, and Distribution. *Environmental Science & Technology*, v.37, p. 4348-4357, 2003.

**MONITORAMENTO DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS
ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE, PLATAFORMA CONTINENTAL E ÁREAS
PROTEGIDAS ADJACENTES (ANEXO 6)**

**SUB-PROJETO: DIVERSIDADE GENÉTICA E SAÚDE DAS TARTARUGAS
MARINHAS**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Sarah Maria Vargas	Doutor II - Coordenação Temática Tartarugas marinhas	UFES
Profissional Mestre - Juliana Justino	Bióloga, Mestre - Coordenação análises laboratoriais	UFES
Pós doutor	Pesquisador	UFES
Iniciação científica	Pesquisador	UFES
Técnico nível superior	Pesquisador	UFES
Técnico nível superior	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

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.

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 encalhes na região de estudo (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.*, 2013 e Shamblin *et al.*, 2014). Animais encontrados mortos e encalhados e 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), *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.

Neste contexto o subprojeto de tartarugas marinhas inclui parte dos objetivos 5 e 11 do Anexo 6, TR4, com as seguintes atividades:

3. OBJETIVOS

Monitorar e comparar com dados anteriores, a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo. 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 das tartarugas marinhas

Monitorar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das populações de tartarugas marinhas em áreas de desova e encalhes na região de estudo.

Meta 2- Avaliação da saúde de tartarugas marinhas

Avaliar a presença de contaminantes no organismo das tartarugas juvenis (*C. mydas*) e adultas (*C. caretta*) a ponto de afetar 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* e observar

Purificação e sequenciamento: Após a amplificação dos fragmentos, as reações serão purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Os fragmentos serão submetidos a reações de sequenciamento nos dois sentidos.

Análises de bioinformática e estatísticas:

As sequências da região controle do DNA mitocondrial serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) por meio do programa MEGA v.6.

Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) serão calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações.

As redes de haplótipos serão construídas com cálculos de Median Joining no programa Network.

Para as análises dos microssatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). Os genótipos dos indivíduos avaliados serão comparados para os locos de microssatélites com o programa Mstools v. 3.1 (Park, 2001) a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

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

Para as análises intrapopulacionais serão calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001) e Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010).

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

Para determinar provável estrutura populacional será 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, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.5. Também serão calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001). Valores de P serão considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Meta 2 - Avaliação da saúde de tartarugas marinhas

Procedimentos de amostragem e conservação das amostras

O monitoramento de tartarugas-marinhas em reprodução será realizado na Foz do Rio Doce durante as temporadas reprodutivas em Linhares, ES. Área controle será a Praia do Forte (Ba). A temporada reprodutiva se estende de setembro a abril, porém as campanhas de coleta de sangue das fêmeas serão feitas de outubro a dezembro de 2018. As coletas de sangue e ovos serão realizadas à noite durante a temporada reprodutiva em dias alternados. A coleta de ovos e filhotes natimortos será feita diariamente, pela manhã de novembro a janeiro.

As praias serão monitoradas das 20 às 4h em busca de fêmeas em desova.

A captura das *Caretta caretta* será manualmente após a postura. Após capturados, 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.

Após serem capturados, 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 massa com dinamômetro analógico com capacidade de 200 Kg com escala mínima de 0,2 Kg para.

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.

Os ovos serão coletados no momento da desova (sendo 3 por ninho de *C. caretta*, totalizando 60, e até 45 ovos 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 filhotes natimortos (aproximadamente 3 por ninho) sejam coletados após a eclosão, armazenados congelados em sacolas plásticas a -80°C (SAKAI et al., 1995; ROE et al., 2011). O monitoramento dos ninhos e coleta de filhotes natimortos será realizado em conjunto com a equipe do Projeto TAMAR que também obterá os dados de eclodibilidade.

Serão coletadas amostras de sangue de 60 *Caretta caretta* ao longo da temporada reprodutiva em Linhares e na Praia do Forte. 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 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.

Para ovos e filhotes deverá ser obtido um n mínimo de 3 ovos e filhotes por ninho, que podem ser avaliados individualmente ou em pool, totalizando 60 ninhos por temporada para *Caretta caretta* e 45 para *Dermochelys coriacea*.

Quadro 1: Número e tipo de amostras que serão coletadas na Foz do Rio Doce e nas áreas controle.

Amostra	Número de amostras	Total de amostras na temporada
Plasma (C. caretta)	120 fêmeas	120 amostras
Plasma (C. mydas)	60 juvenis	60 amostras
Ovo (C. caretta)	180 (3 por ninho)	60 pools
Ovo (D. coriacea)	45 (3 por ninho)	15 pools
Natimorto (C. caretta)	180 (3 por ninho)	60 pools
Natimorto (D. coriacea)	45 (3 por ninho)	15 pools
Total		360

Serão realizadas 4 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 4 campanhas no Recife de Coroa Vermelha - Ba (Quadro 1). Por ano serão capturados 45 indivíduos em cada área de alimentação, portanto serão 90 amostras de plasma.

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.

É importante salientar que as análises genéticas e de saúde precisam dos dados de captura e, portanto, o monitoramento referente às tartarugas será feito em parceria com a Fundação Pro-Tamar, mas não haverá sobreposição nas coletas, uma vez que estas atividades já são realizadas por meio de contrato com a Fundação Pró-Tamar.

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 sódica 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.

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 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-fosforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises serão realizadas no sistema automatizado Beckman Coulter AU2700, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al., 2015).

Análises de contaminantes orgânicos e elementos traço

A extração dos contaminantes orgânicos do plasma será feita por um protocolo líquido-líquido por centrifugação usando ciclohexano grau HPLC como solvente e cis heptacloropóxido a 1 ppm como padrão interno. O sobrenadante é filtrado a 0,2 µm e evaporado em corrente de nitrogênio e resuspendido a 0,4 ml em ciclohexano (CAMACHO et al., 2013a).

A separação cromatográfica a gás será feita acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo ou equivalente disponível na RRDM, segundo Camacho et al. (2012). O limite de detecção será de 0,01 ng/mL definido como três vezes a média do sinal de fundo.

Serão analisados os seguintes contaminantes:

- a) 18 pesticidas organoclorados (OCPs): metoxiclor; quatro isômeros de hexaclorociclohexano (α -, β -, γ -, e δ - HCH); p,p'-dicloro-difenil-tricloroetano (p,p'-DDT) e metabólitos (p,p'-DDE, e p,p'-DDD); hexaclorobenzeno (HCB); aldrin; dieldrin; endrin; clordane (cis- e trans-isômeros); mirex; endosulfan (α -e β -isômeros) e endosulfan-sulfato;
- b) 18 congêneros de bifenis policlorados (PCB): 6 marcadores (M-PCB = PCBs #52, 101, 118, 138, 153 e 180) e 12 dioxin-like PCBs (DL-PCB=PCBs #77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189), numerados de acordo com a IUPAC;
- c) 16 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos prioritários para a US-EPA: naftaleno; acenaftileno; acenafteno; fluoreno; antraceno; fenantreno; fluoranteno; pireno; benzo[a]antraceno; criseno;

benzo[b]fluoranteno; benzo[k]fluoranteno; benzo[a]pireno; indeno[1,2,3,-cd] pireno; dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno.

A dosagem de elementos traço será realizada por Espectrometria de Emissão com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP/EOS ou equivalente disponível na RRDM após digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a quente (CAMACHO et al., 2013c).

Avaliação do Sucesso Reprodutivo

Para avaliar a relação entre os contaminantes e o sucesso reprodutivo será necessário aguardar a emergência dos filhotes (aproximadamente 60 dias). O sucesso reprodutivo é medido pela taxa de sucesso de eclosão e emergência. 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 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.

Apresentação dos resultados

Os resultados serão apresentados em 1 relatório final ao término do programa ou de acordo com as regras da RRDM.

Os resultados dos analitos serão expressos em tabelas de estatística descritiva apresentando média e desvio padrão de dados com distribuição normal e mediana e erro padrão da média para dados com distribuição assimétrica. Também serão expressos os valores máximo e mínimo.

Serão utilizados gráficos de box-plot apresentando percentis 2,5 e 97,5, média, outliers e extremos para representação dos valores obtidos.

Correlações de Spearman serão representados por gráficos de correlação apresentando a equação da reta e valor de r^2 obtidos.

Análises estatísticas comparativas serão apresentadas com valores do teste estatístico utilizado e o valor de p para um intervalo de confiança de 95%.

7. REFERÊNCIAS

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.

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

- EDGAR R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** 32:1792–1797.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564-567, 2010.
- GOUDET, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, and T. C. MARSHALL, 2007 Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Mol. Ecol.** 16: 1099–1106.
- PARK, S. D. E. 2001. MSTools: Microsatellite toolkit for MS Excel. Trinity College, Dublin. <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>
- REIS EC, SOARES LS, VARGAS SM, SANTOS FR, YOUNG RJ, BJORN DAL KA, BOLTEN AB, 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.
- 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.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELL Y, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, n. 155, p. 945-959, 2000.
- 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/>.
- THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
- SHAMBLIN, BM, AB BOLTEN, FA ABREU-GROBOIS, KA BJORN DAL, 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.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 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 SM, MOLFETTI E, VILAÇA ST, MONTEIRO D. ESTIMA SC, SOARES LS, ALMEIDA AP, de THIOSY B, NARO-MACIEL E, SANTOS FR. Mixed stock analysis of leatherback turtles feeding in Brazil: Records over four years. **Proceeding of the 33rd Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Baltimore, Maryland, USA.** 2013

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA
E MARINHA (ANEXO 7 – ICTIOFAUNA)**

**SUB-PROJETO: ESTUDO E MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA
DULCÍCOLA - ECOLOGIA DE PEIXES**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Dergam	Coordenador do Projeto	UFV
Luiz Fernando Duboc	Coordenador sub-projeto	CEUNES - UFES
Profissional Mestre II/Profissional Pleno II	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Júnior (Biólogo)	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Júnior (Biólogo)	Pesquisador	UFES - CEUNES
Pós-doutorado	Pesquisador	UFV
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES - CEUNES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES - CEUNES
Pós-doutorado	Pesquisador	UFES - CEUNES

2. ESCOPO

Análises ecológicas de amostras de peixes de ambientes dulcícolas.

3. OBJETIVO

Determinar parâmetros ecológicos das espécies coletadas em ambientes dulcícolas, conforme realizado na análise diagnóstica obtida com coletas mensais no primeiro ano, das espécies de peixes coletadas nos 8 pontos indicados no TR Monitoramento Cláusula 165, Anexo 7. Nestes primeiros 12 meses, serão obtidos os parâmetros ecológicos (comunidades, populações e relações com habitat). A partir dos resultados obtidos, deverão ser escolhidas as espécies a serem monitoradas quanto aos parâmetros populacionais (dieta/ecologia trófica, reprodução e recrutamento).

A integridade ambiental será aplicada conforme proposta por Nessimian et al. (2008), utilizando a ficha de campo apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Características do habitat utilizados na avaliação de sítios de amostragem para cálculos de índice de integridade de habitat. Fonte: Nessimian *et al.* (2008).

Padrão de uso da terra além da zona ripária:	
Floresta primária contínua / fragmento de 1.000.000 m ² / fragmento 100.000m ²	6
Floresta secundária alta/Floresta secundária mista	5
Floresta secundária baixa	4
Pastagem	3
Culturas perenes	2

Culturas de ciclo curto / solo exposto	1
Largura da mata ciliar:	
Floresta contínua	6
Floresta com largura entre 30 e 100 m	5
Floresta com largura entre 5 e 30 m	4
Floresta com largura entre 1 e 5 m	3
Floresta ripária ausente, mas com algumas espécies arbustivas e árvores pioneiras	2
Mata ciliar e vegetação arbustiva ausentes	1
Integralidade da mata ciliar:	
Mata ciliar intacta, sem pausas na vegetação	4
Interrupções ocorrendo em intervalos de 50 m	3
Pausas frequentes com erosões e machas a cada 50 m	2
Profundamente marcado por erosões ao longo de todo o seu comprimento	1
Vegetação da zona ripária a menos de 10 m de canal:	
Mais de 90% da densidade de plantas constituída por árvores não pioneiras ou arbustos	4
Misto de espécies pioneiras e árvores maduras	3
Misto de gramíneas, árvores pioneiras esparsas e arbustos	2
Gramíneas e alguns arbustos	1
Dispositivos de retenção:	
Canal com pedras e/ou troncos velhos firmemente fixados no local	4
Rochas e/ou trocos presentes, mas cobertos com sedimento	3
Dispositivos de retenção soltos, que se movem com o fluxo	2
Canal com areia e poucas obstruções	1
Sedimentos do Canal:	
Pouco ou nenhum alargamento do canal resultante do acúmulo de sedimentos	4
Algumas pedras e pouco silte	3
Sedimento formado por pedras; areia e silte comuns	2
Canal com presença de ilhas ou com fluxo alterado	1
Estrutura do banco:	
Bancos pouco visíveis	5
Bancos estáveis, formados por rochas e solo firme, apresentando gramíneas, arbustos ou raízes de árvores	4
Bancos firmes, mas nem sempre mantidos por gramíneas e arbustos	3

Bancos de terra solta mantidos por uma camada esparsa de gramíneas e arbustos	2
Bancos instáveis, facilmente alteráveis, com terra solta ou areia	1
Erosão:	
Pouca, não evidente ou restrita a áreas com apoio da raiz	4
Somente em curvas e estreitamentos	3
Frequente, erosão das margens e raízes	2
Erosão severa ao longo do canal, queda de bancos	1
Leito do rio:	
Fundo de pedra de vários tamanhos, interstícios evidentes	4
Fundo de pedras que se movem com facilidade, com pouco silte	3
Fundo de silte, cascalho e areia, estável em alguns lugares	2
Fundo instável e uniforme de areia e silte, substrato rochoso ausente	1
Corredeiras e piscinas, ou meandros:	
Distintos, ocorrendo em intervalos de 5-79 de largura	4
Irregularmente espaçados	3
Piscinas longas separam corredeiras curtas, meandros ausentes	2
Meandros e corredeiras/piscinas ausentes	1
vegetação aquática:	
Quando presente, consiste de musgos e manchas de algas	4
Algas dominantes em piscinas, plantas vasculares ao longo da borda	3
Tapetes de algas presentes, algumas plantas vasculares, poucos musgos	2
Tapetes de algas cobrem a parte inferior, plantas vasculares dominam o canal	1
Detrito:	
Consistindo principalmente de folhas e madeira, sem sedimento	5
Consistindo principalmente de folhas e madeira, com sedimento	4
Poucas folhas e madeira, detritos orgânicos, com sedimento	3
Sem folhas, galhos e troncos, matéria orgânica fina e grossa, com sedimento	2
Sedimento anaeróbico fino, sem matéria orgânica grossa	1

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Estudo de Comunidade

Determinar a ocorrência, abundância, biomassa e tamanho dos indivíduos. Obtenção de dados sobre alimentação e ecologia trófica (origem do alimento, fontes de carbono, posição no nível trófico), reprodução e

recrutamento. Seleção de espécies a serem monitoradas.

Meta 2- Estudo Populacional

Análise por espécie, dos parâmetros populacionais. As comunidades serão monitoradas quanto à riqueza, dominância e diversidade. A relação das espécies com o habitat avaliado nas espécies selecionadas.

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>
Caracterização da ecologia da ictiofauna, a partir de resultados obtidos em coletas mensais, durante 12 meses, em 8 locais na porção dulcícola do rio Doce. Será feita a seleção de espécies de peixes, preferivelmente de grande porte e de relevância comercial, para estudos de alimentação e reprodução.	Jorge Dergam, Luiz Fernando Duboc
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>A composição ictiofaunística será apresentada em tabelas (total e por local de coleta), indicando para todas as espécies: nome científico, nome popular, número de coleta e locais de amostragem.</p> <p>Todas as espécies serão categorizadas como raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras e comerciais. Para avaliar a representatividade da amostra, será utilizada a abordagem da curva do coletor.</p> <p>A caracterização ambiental de cada ponto amostrado será realizada através do Índice de Integridade de Habitat (IIH) de Nessimian <i>et al.</i>, (2008).</p> <p>A descrição das comunidades será baseada nos seguintes índices:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988). 2) Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por meio da aplicação de procedimento bootstrap (MANLY, 1997); 3) Equitabilidade (SMITH, WILSON, 1996); 4) Constância de ocorrência (C) das espécies; 5) Coeficientes de similaridade/dissimilaridade; 6) Índice de Dominância (MCNAUGHTON, 1968) 	Jorge Dergam, Luiz Fernando Duboc
<p>Deverão ainda ser realizadas análises multivariadas, visando verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies e quanto à influência das características ambientais/fisiográficas e geográficas dos pontos sobre a distribuição das espécies.</p> <p>Deverão ser selecionadas espécies de peixes, de preferência de grande porte e de interesse comercial, a fim de serem monitoradas futuramente através de telemetria.</p> <p>Para as espécies com ocorrência na Área Ambiental 1 e constantes nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, se não for possível a coleta dos dados sobre suas dinâmicas populacionais, será realizado um levantamento bibliográfico detalhando a biologia da espécie em questão. Serão determinados os estádios de desenvolvimento gonadal das espécies mais abundantes e das espécies de importância para a pesca, por meio da classificação de maturação gonadal.</p> <p>A classificação macroscópica das gônadas será validada microscopicamente para cada estágio.</p>	Jorge Dergam, Luiz Fernando Duboc

<p>Será determinado o tamanho médio em que metade da população possui gônadas desenvolvidas e aptas para a reprodução (L50), e o comprimento com o qual todos os indivíduos estão aptos a se reproduzir (L100), por sexos separados. Será determinada a variação temporal da frequência de estádios de maturação gonadal considerando o ciclo hidrológico completo.</p> <p>Será determinada a relação gonadossomática (RGS) de cada indivíduo, o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS, de acordo com a metodologia proposta por Vazzoler (1996), e os resultados obtidos serão apresentados em gráficos.</p> <p>Se espécies ameaçadas de extinção forem coletadas, e que não seja possível sua devolução ao ambiente, estas também serão submetidas às análises descritas anteriormente.</p>	
--	--

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

A composição ictiofaunística será ser apresentada na forma de tabelas (no seu total e discriminada por local de coleta), indicando para todas as espécies: nome científico, nome popular, número de coleta e locais de amostragem. As espécies serão também classificadas como: raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras e comerciais.

Para estimar a representatividade da amostra, será utilizada a abordagem da curva do coletor. Modelos de ajuste da curva serão utilizados para estimativas da riqueza total, como Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, ACE e ICE, e Bootstrap (COLWELL, CODDINGTON, 1994). A comunidade será caracterizada com os seguintes índices:

- o Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988).
- o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por reamostragem 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;
- o Coeficientes de similaridade/dissimilaridade, como os de Bray-Curtis, Sorensen, Morisita-Horn e Jaccard, para comparação entre localidades e ciclos de monitoramento (MAGURRAN, 1988); Índice de Dominância (MCNAUGHTON, 1968).

Serão realizadas análises multivariadas, visando verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies (MANLY, 1997; GAUCH JR, 1986) e influência das características ambientais/fisiográficas/geográficas dos pontos sobre a distribuição das espécies (MANLY, 1997; TER BRAAK, SMILAUER, 2002).

Serão selecionadas espécies de peixes, de preferência de grande porte e de interesse comercial, a fim de serem futuramente monitoradas quanto à utilização do habitat através de telemetria, com o uso de estações acústicas para detectar transmissores acústicos implantados no corpo destas espécies previamente selecionadas.

Será realizado um levantamento na literatura, sobre as condições prévias ao acidente. No caso das espécies constantes nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, na impossibilidade de obtenção de dados sobre a dinâmica de populações das mesmas, será realizado um levantamento bibliográfico detalhando a biologia da espécie em questão.

Serão determinados os estádios de desenvolvimento gonadal das espécies mais abundantes e das espécies de importância para a pesca, por meio da classificação de maturação gonadal determinada por Vazzoler (1996) e Brito e Bazzoli (2003). A classificação macroscópica das gônadas será estatisticamente validada microscopicamente.

Finalmente, será determinado o tamanho médio em que metade da população possui gônadas desenvolvidas, estando apta à reprodução (L50), e o comprimento com o qual todos os indivíduos estão aptos a se reproduzir (L100), por sexos separados, e será determinada a variação temporal da frequência de estádios de maturação gonadal considerando o ciclo hidrológico completo. Será determinada a relação gonadossomática (RGS) de cada indivíduo, o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS, de acordo com a metodologia proposta por Vazzoler (1996). Os resultados obtidos serão apresentados em gráficos. Em caso de coleta de espécies ameaçadas de extinção, se não for possível sua devolução ao ambiente, estas também serão submetidas às análises descritas anteriormente.

A distribuição de pontos e a frequência amostral segue o que está definido no Anexo 7 do TR4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Encontram-se listadas juntamente com as demais referências do Sub-Projeto a seguir.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA
E MARINHA (ANEXO 7 – ICTIOFAUNA)**

**SUB-PROJETO: ESTUDO E MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA
DULCÍCOLA - GENÉTICA**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Tomas Hrbek	Coordenador sub-projeto	UFAM
Izeni Pires Farias	Membro de Equipe	UFAM
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFAM
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFAM
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES-UFV
Pos Doutorado	Pesquisador	UFES-UFAM
Pos Doutorado	Pesquisador	UFES-UFAM
Pos Doutorado	Pesquisador	UFV-UFAM

2. ESCOPO

Análises genéticas de amostras de peixes de ambientes dulcícolas

3. OBJETIVO

Determinar as espécies e a genética de populações das espécies de peixes coletadas na porção capixaba conforme Anexo 2.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Genética de populações e DNA Barcoding.

Caracterização das espécies utilizando marcadores nucleares e microssatélites, e marcadores mitocondriais. Definição de 15 espécies-alvo de diferentes famílias para estudos genéticos populacionais.

Meta 2- Genética de populações das espécies-alvo

Análise por espécie, dos parâmetros de genética de populações.

5. PRODUTOS

<p>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></p>	<p>RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i></p>
---	--

<p>Lista de 15 espécies de peixes a serem analisadas</p> <p>Sequências dos iniciadores dos 10 loci de microssatélites das 15 espécies</p> <p>DNA extraído de 6600 amostras</p> <p>Genótipos de 6600 amostras para 10 loci de microssatélites</p> <p>Sequências de 6600 amostras para 2 genes mitocondriais e nucleares</p> <p>DNA barcodes de 5 a 10 amostras por espécie</p>	<p>Jorge Dergam, Tomas Hrbek</p>
---	----------------------------------

<p>5.2. ANÁLISE DE DADOS (Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</p>	<p>RESPONSÁVEL (Pessoal Vinculado)</p>
<p>Obtenção de frequências alélicas e número de alelos privados</p> <p>Obtenção de heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He)</p> <p>Teste de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) Estimativa de diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π)</p> <p>Estimativa da endogamia</p> <p>Estimativa da estruturação populacional (AMOVA e ϕ_{ST})</p> <p>Estimativa da ocorrência de eventos de gargalo populacional</p> <p>Analises com DNA <i>barcoding</i></p>	<p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Jorge Dergam</p>

6. METODOLOGIA

Amostras de DNA serão de 30 indivíduos de cada população serão extraídas de cada tecido, utilizando kits comerciais. Os 10 locos microssatélites, os 2 genes mitocondriais e os 2 genes nucleares serão amplificados via PCR padrão. Posteriormente adaptadores e identificadores (barcodes) individuais serão adicionados nos produtos do PCR. Os produtos do PCR serão sequenciados no IonTorrent PGM, as sequências resultantes separadas por indivíduo e por gene/microssatélite, e os bancos de dados serão montados para as análises. Parâmetros populacionais, tais como equilíbrio Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada e esperada serão obtidos utilizando o software Genepop v 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). estatísticas de composição de nucleotídeos e padrões de substituições inferidos com a utilização do programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2013). A análise de divergência de sequência será inferida com o modelo Kimura-2-parametros, K2P. Estatísticas de diversidade e polimorfismo de DNA serão obtidas: diversidade haplotípica h, diversidade nucleotídica π , partição da variância dentro e entre populações com e ocorrência de eventos de gargalo populacional utilizando ARLEQUIN, 2010). A análise de AMOVA permite a partição dos componentes de variância entre os níveis definidos em cada análises (por exemplo, dentro versus entre populações), considerando cada espécie por separado. A análise de AMOVA segundo Excoffier et al. (1992) estima índices de estrutura genética (endogamia e estruturação populacional) utilizando informação do conteúdo alélico dos haplótipos, assim como da sua frequência. A análise proposta por Excoffier et al. (1992) estende estudos anteriores de Cockerham (1973), Long(1986) e Long, Smouse e Woods (1987) sobre correlações alélicas entre demes para uma análise comparável da diversidade haplotípica. Este método substitui os parâmetros tradicionais F_{ST} e G_{ST} , pelos parâmetros ϕ_{ST} , ϕ_{ST} e ϕ_{SC} utilizando as seguintes correlações:

ϕ_{ST} é a correlação de haplótipos tomados ao acaso dentro das populações, em relação à correlação de pares de haplótipos tomados ao acaso da espécie;

ϕ_{ST} é a correlação de haplótipos tomados ao acaso dentro das populações, em relação à correlação de pares de haplótipos tomados ao acaso, dentro de toda a espécie;

ϕ_{SC} é a correlação de haplótipos tomados ao acaso, dentro de um grupo de populações, em relação à correlação de pares de haplótipos de toda a espécie.

A informação sobre as diferenças do conteúdo alélico entre os haplótipos é alimentado numa matriz euclidiana de distâncias elevadas ao quadrado. A significância dos componentes de covariância associada aos possíveis diferentes níveis de estrutura genética (intra-individual, intrapopulacional, dentro de grupos de populações e entre grupos) é testado com procedimentos de permutação não-paramétricos (Excoffier et al., 1992).

As análises de DNA *barcoding* serão realizadas atendendo o disposto no Termos de Referência 4 e na Nota Técnica CTBIO da seguinte forma: pelo menos 5 indivíduos de todas espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao longo do período do monitoramento e 10 indivíduos da família Characidae, em cada um dos locais. Adicionalmente será desenvolvida uma biblioteca de DNA barcodes para as espécies nativas da bacia que ainda não possuem a sequência registrada. Para a amplificação e sequenciamento dos segmentos serão utilizados os primers descritos por Ward et al. (2005). As sequências obtidas serão submetidas ao banco de dados BOLD (RATNASINGHAM, HEBER, 2013) (<http://www.boldsystems.org/>), para verificar a correspondência e similaridade com as sequências armazenadas no banco de dados. A identificação de Barcode gap e o “Barcode Index Number” (RATNASINGHAM, HEBERT, 2013) serão conduzidas por meio do site do *Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>). As sequências obtidas serão depositadas no banco de dados de forma a serem reconhecidas formalmente como sequências barcode das espécies em questão. Os registros conterão o nome da espécie, o voucher com os dados de catalogação e a instituição de depósito, dados de coleta como nome dos coletores, data e localização com coordenadas geográficas, nome do especialista que identificou a espécie, a sequência da região barcode com pelo menos 500 pb, informações sobre os primers utilizados na amplificação do fragmento de DNA e os respectivos eletroferogramas gerados de ambas as fitas de DNA (RATNASINGHAM, HEBERT, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Cockerham, C. C. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74: 679-700.

Colwell, R. K.; Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 345: 101-118.

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

Excoffier, L., Smouse, E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-191.

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

Long, J. C. 1986. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam- speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* 112: 629-647.

Long, J.C.; Smouse, P.E.; & Wood, J.W. 1987. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam- speaking people. II. The genetic distance between population subdivisions. *Genetics* 117: 273-283.

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

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

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

Nessimian, J.L.; Venticinque, E.M.; Zuanon, J.; De Marco JR., P.; Gordo, M.; Fidelis, L.; Batista, J.D.; Juen, L. 2008. Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. *Hydrobiologia* 614: 117-131.

Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: the barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.

Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system. *PlosOne* 8: e66213.

Raymond, M., Rousset, F. 1995. "GENEPOP Version 1.2: Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism." *Journal of Heredity* 86: 248-49.

Smith, B. & Wilson, J. A 1996. Consumers' Guide to Evenness Indices. *Oikos* 76(1): 70-82.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Ter Braak, C.J.F. & Smilauer, P. 2002. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)*. Ithaca: Microcomputer Power, 500 p.

Vazzoler, A.E.A. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 169 p.

Ward, R. D.; Zemlak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R. & Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 360: 1847-1857.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA
E MARINHA (ANEXO 7 – ICTIOFAUNA)**

SUB-PROJETO: ESTUDO E MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Maurício Hostim-Silva	Coordenador	UFES
Jean-Christophe Joyeux	Coordenador de sub-projeto	UFES
Ana Paula Cazerta Farro	Pesquisador	UFES
Athila Bertoncini Andrade	Pesquisador	UniRio
Carlos Werner Hackrad	Pesquisador	UFSB
Ciro Colodetti Vilar de Araujo	Pesquisador	UFES
Fabiana César Félix-Hackrad	Pesquisador	UFSB
Felippe Alexandre Lisboa de Miranda Daros	Pesquisador	UNESP/Campus Registro
Gabriel C. Cardozo Ferreira	Pesquisador	UFES
Helen Audrey Pichler	Pesquisador	UFES
Igor Emiliano Gomes Pinheiro	Pesquisador	FURG
Joelson Musiello Fernandes	Pesquisador	UFES
Julien Chiquieri	Pesquisador	UFES
Ryan Carlos de Andrades	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

Este estudo contemplará os produtos previstos para o **ano 1** do Termo de Referência (TR) 04 – Anexo 07 (Estudo e Monitoramento da Ictiofauna Marinha e Estuarina - SEI 0502135, complementado pela Nota Técnica CTBio 03/2017), previsto para cinco anos. Desta forma, serão coletados dados biológicos para os estudos da ictiofauna estuarina/costeira (incluindo recifal) e carcinofauna estuarina/costeira, atingidos direta ou indiretamente em consequência da ruptura da barragem de Fundão (Mariana/MG). Os resultados preliminares descreverão as variações espaciais e temporais nos aspectos populacionais, da comunidade e das relações destas com as variáveis ambientais, após o desastre. Serão estudados os peixes e crustáceos atingidos diretamente pelo desastre, no estuário do rio Doce (macroescala, 10km de distância entre cada ponto amostral). Visando determinar o espectro da biota atingida indiretamente pelo impacto, serão estudadas a ictiofauna e carcinofauna dos estuários dos rios Ipiranga, São Mateus (norte do Espírito Santo) e Caravelas (RESEX Cassurubá, sul da Bahia) (os três em mesoescala, 2km entre os pontos amostrais) e áreas marinhas adjacentes. Ainda, será monitorada a ictiofauna dos ambientes recifais adjacentes aos estuários estudados, e também aquela dos recifes situados na APA Costa das Algas (sul do Espírito Santo). As populações de peixes e crustáceos serão descritas quanto a ocorrência, abundância, biomassa e tamanho médio, enquanto as respectivas comunidades serão descritas através de riqueza de espécies, dominância e diversidade. Já o uso do habitat por espécies de peixes selecionadas será estudado através de telemetria, microquímica de otólitos, e fluxo de larvas/recrutas e adultos/juvenis entre os estuários e ambientes costeiros adjacentes. Ao final desta etapa, serão selecionadas espécies (mais abundantes e/ou de importância comercial) para os estudos dirigidos de reprodução e ecologia trófica.

3. OBJETIVO

Coletar dados para a descrição preliminar (ano um) dos aspectos populacionais (abundância, biomassa e tamanho), da comunidade e uso de habitat, dos peixes e crustáceos estuarinos/costeiros (incluindo peixes recifais) afetados direta (rio Doce e adjacências) ou indiretamente (rios Caravelas, São Mateus e Ipiranga, e adjacências) pelos rejeitos de minério resultantes do rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG).

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Ecologia trófica da ictiofauna

A constância de ocorrência, a abundância relativa (em número e peso) e o comprimento dos peixes capturados nos estuários do rio Doce (pequena escala) e Piraquê-açu serão descritos, para fundamentar a seleção das espécies a serem monitoradas quanto à dieta e ecologia trófica.

Meta 1.1- Coletas de amostras da ictiofauna com rede de arrasto, em 12 pontos (6 pontos em cada estuário, em pequena escala) nos estuários do rio Doce (Regência) e Piraquê-açu;

Meta 1.2- Triagem, identificação e biometria (comprimento, peso) da ictiofauna coletada nos estuários do rio Doce (pequena escala) e Piraquê-açu coletados durante 13 meses;

Meta 1.3 - Organização de banco de dados de ictiofauna: digitar e organizar os dados coletados e triados durante 13 meses;

Meta 1.4- Análises da estrutura de populações de peixes estuarinos/marinhos: calcular a constância de ocorrência, a abundância relativa (em número e peso) e descrever o comprimento das espécies capturadas nos estuários do rio Doce (pequena escala) e Piraquê-açu; Selecionar as espécies para análises posteriores da dieta e ecologia trófica;

Meta 1.5- Preparação de indivíduos coletados para deposição em uma Coleção Ictiológica.

Meta 2- Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos

Serão descritas ocorrência, abundância, biomassa e tamanho dos indivíduos, além de calcular os descritores da ictiofauna (riqueza, diversidade e dominância). Para cada estuário (rio Doce, em macroescala, e estuários ao norte), serão elaboradas tabelas por mês e ponto, da seguinte forma:

Meta 2.1- Coleta de peixes e crustáceos nos quatro estuários por 12 meses, realizada através de 48 expedições;

Meta 2.2- processar os peixes coletados durante 13 meses;

Meta 2.3- digitar os dados coletados e processados durante 13 meses.

Meta 3 - Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

Será estimada a diversidade genética, frequência e número de alelos efetivos e provados, heterozigosidade observada e esperada para as espécies estudadas coletas na região no rio Doce (macroescala), estuários ao norte deste e suas áreas adjacentes. Além disso, serão realizados estudos genéticos envolvendo DNA mitocondrial (Barcoding) para as espécies de peixes coletadas, visando a composição de um banco de DNA das espécies da região.

Meta 3.1- Genética de populações de peixes: ao longo de um ano serão coletadas amostras em cada localidade estudada seguindo um gradiente de impacto a partir do rio Doce (totalizando mínimo 10 indivíduos de cada espécie) para um estudo de genética de populações para as 15 espécies de peixes selecionadas segundo sua abundância e disponibilidade;

Meta 3.2- microssatélites: DNA das amostras será extraído e enviado para que marcadores moleculares microssatélites sejam desenvolvidos para as espécies selecionadas;

Meta 3.3- DNA mitocondrial (Barcoding): coleta de amostras de cinco indivíduos de cada espécie de peixe para as análises durante o período de estudo.

Meta 4- Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos, no estuário do rio Doce e área marinha adjacente

Meta 4.1- coleta de 300 exemplares de peixes estuarinos/marinhos de espécies de importância comercial, abundantes e frequentes;

Meta 4.2- processamento preliminar de otólitos dos exemplares coletados durante o período;

Meta 5 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais

Serão realizados censos visuais subaquáticos com o objetivo de descrever ocorrência e abundância, e estimar tamanho dos peixes recifais, além de calcular os descritores da ictiofauna (riqueza, diversidade e dominância), através de censo visual.

Meta 5.1- realizar 05 expedições de mergulho para censos visuais, sendo uma em cada uma das áreas de estudo presentes no TR: RESEX Cassurubá (recifes de Sebastião Gomes, Nova Viçosa, Coroa Vermelha e parcel das Paredes), Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e APA Costa das Algas;

Meta 5.2- análises de imagens (vídeos, fotografias) e processamento de dados de censos visuais;

Meta 5.3- realizar duas expedições para coleta de larvas de peixes com armadilhas de luz em cada uma das 05 áreas de estudos de peixes recifais;

Meta 5.4- processamento e análise das amostras provenientes das armadilhas de luz e cálculo dos descritores da comunidade (cálculo de CPUE por armadilha, cálculo do índice de diversidade de Shannon-

Wiener, Análise de Variância entre a CPUE e diversidade de espécies capturadas pelas armadilhas de luz para o fator localidade amostrada);

Meta 5.5- correlacionar os dados obtidos com a armadilha de luz, acerca do aporte larvário com os dados de juvenis obtidos pelos censos visuais para entender os padrões de recrutamento na área impactada;

Meta 6- Estudos de telemetria de peixes no estuário do rio Doce

Será realizado o monitoramento contínuo do uso de habitat e deslocamentos, de espécies de peixes de importância comercial no estuário do rio Doce e área marinha adjacente, utilizando telemetria acústica.

Meta 6.1- estabelecer o sistema de rastreamento e implantar transmissores acústicos em 60 exemplares de peixes de duas espécies, de preferência aquelas de interesse comercial;

Meta 6.2- localizar a distribuição de áreas de forrageio e deslocamentos da espécie alvo do monitoramento;

Meta 6.3- identificar e acompanhar a influência da variação mensal dos processos físicos e químicos sobre a distribuição dos exemplares monitorados na região impactada;

Meta 6.4- obter dados para a futura descrição das síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 6.5- determinar síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 7- Estudos de telemetria de peixes recifais

Será realizado o monitoramento contínuo do uso de habitat e deslocamentos, de espécies de peixes de importância comercial nos ambientes recifais adjacentes ao rio Doce, utilizando telemetria acústica.

Meta 7.1- estabelecer o sistema de rastreamento e implantar transmissores acústicos em 60 exemplares de peixes de duas espécies, de preferência aquelas de interesse comercial;

Meta 7.2- localizar a distribuição de áreas de forrageio e deslocamentos da espécie alvo do monitoramento;

Meta 7.3- identificar e acompanhar a influência da variação mensal dos processos físicos e químicos sobre a distribuição dos exemplares monitorados na região impactada;

Meta 7.4- obter dados para a futura descrição das síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 7.5- determinar síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 8- Relatórios técnicos

Meta 8.1- 01 relatório técnico semestral no mês 09;

Meta 8.2- 01 relatório técnico anual no mês 15.

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> (continua)
Meta 1: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de peixe por estuário estudado (Doce em pequena escala e Piraquê-açú;	Prof. Jean Joyeux
Meta 2: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de peixe por estuário estudado;	Prof. Maurício Hostim
Meta 2: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de crustáceo por estuário estudado;	Prof. Julien Chiquieri
Meta 3.1: - número de amostras coletadas das 15 espécies de peixes selecionadas; - número de extrações efetuadas; - número de loci de microssatélites desenvolvidos e otimizados para cada espécie;	Prof ^a Fabiana Cézar Félix-Hackradt

Meta 3.2: - número e nome das espécies identificadas molecularmente; - número de sequências <i>barcoding</i> geradas para o período de 12 meses para cada espécie;	Prof ^a Ana Paula Cazerta Farro
---	---

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> (conclusão)
Meta 4: - número de otólitos de peixes estuarinos/marinhos de importância comercial coletados, por espécie; - número de otólitos cortados, fixados e preparados em lâminas para análise; - dados das análises microquímicas dos otólitos;	Prof. Felipe A. L. M. Daros
Meta 5: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de peixe recifal; - distribuição espacial das espécies de peixes recifais (larvas e juvenis/adultos);	Prof. Carlos Werner Hackradt e Prof ^a Fabiana Cézar Félix-Hackradt
Meta 6: - pontos georreferenciados da localização de duas espécies de peixes estuarino/marinhos - movimentação (distância máxima linear e polígono convexo máximo) de duas espécies de peixes estuarinos/marinhos	Prof. Maurício Hostim e Prof. Carlos Werner Hackradt
Meta 7: - pontos georreferenciados da localização de duas espécies de peixes recifais - movimentação (distância máxima linear e polígono convexo máximo) de duas espécies de peixes recifais	Profs. Maurício Hostim e Carlos Werner Hackradt

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i> (continua)
Meta 1: - variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes estuarinos/marinhos por estuário estudado (Doce em pequena escala e Piraquê-açú;	Prof. Jean Joyeux
Meta 2: - variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes estuarinos/marinhos; - variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de crustáceos estuarinos/marinhos;	Prof. Maurício Hostim e Prof. Julien Chiquieri
Meta 3.1 - otimização dos protocolos de extração; - otimização dos microsatélites para as 15 espécies selecionadas;	Prof ^a Fabiana Cézar Félix-Hackradt
Meta 3.2 - resultados da identificação das espécies via DNA mitocondrial (<i>Barcoding</i>) de 05 indivíduos por espécie de peixe capturada do mês 01 ao mês 10;	Prof ^a Ana Paula Cazerta Farro
Meta 4: - análise do perfil Sr:Ca entre o núcleo e a borda dos otólitos; - assinatura química do núcleo e da borda dos otólitos;	Prof. Felipe A. L. M. Daros

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i> (conclusão)
Meta 5: - variações espaço-temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes recifais acessada pela análise de variância desbalanceada (Beyond-BACI); - variações espaço-temporais nos padrões de assentamento de larvas e recrutamento de juvenis acessada pela análise de variância desbalanceada (Beyond-BACI);	Prof. Carlos Werner Hackradt e Prof ^a Fabiana César Félix-Hackradt
Meta 6: - estimativa da área de vida de duas espécie de peixes recifais, calculadas à partir do método de Kernel "Kernel Utilization Density" para KUD50% e KUD95%; - comparação das áreas de vida entre habitats e a área impactada e área controle por modelos lineares generalizados; - mapas de distribuição de áreas de vidas e modelos selecionados (seleção através de Akaike Information Criteria) entre os locais impactado e controle;	Prof. Maurício Hostim e Prof. Carlos Werner Hackradt
Meta 7: - estimativa da área de vida de duas espécie de peixes recifais, calculadas à partir do método de Kernel "Kernel Utilization Density" para KUD50% e KUD95%; - comparação das áreas de vida entre habitats e a área impactada e área controle por modelos lineares generalizados; - mapas de distribuição de áreas de vidas e modelos selecionados (seleção através de Akaike Information Criteria) entre os locais impactado e controle;	Prof. Maurício Hostim e Prof. Carlos Werner Hackradt

As análises finais serão feitas comparando os resultados do primeiro ano com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

6.1 Área de estudo

Coletas mensais serão realizadas para estudo da ictiofauna e carcinofauna na foz do rio Doce (Linhares/ES), área diretamente impactada pelo rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG), e sua área marinha adjacente. Além deste, visando o monitoramento de um gradiente das áreas indiretamente atingidas pelo desastre, serão estudados os estuários dos rios Ipiranga, São Mateus e Caravelas (BA), e suas áreas marinhas adjacentes (conforme pontos determinados no TR). Em cada área (rio e área adjacente) serão amostrados nove pontos distantes 2km entre si, exceto no rio Doce, que será amostrado em macroescala (9km de distância entre os pontos amostrais).

Expedições semestrais (item 3.1.5 anexo 7-TR4) serão realizadas para cinco áreas recifais, a distâncias crescentes da foz do rio Doce, das quais estão incluídas a 1 - APA da Costa das Algas, os recifes do Espírito Santo (em frente à foz do rio São Mateus), a 3 RESEX de Cassurubá (3.1 - recifes de Sebastião Gomes, 3.2 - Nova Viçosa e 3.3 - Coroa Vermelha, além de 4 - parcel das Paredes) e o 5 - Parque Nacional Marinho de Abrolhos, além dos recifes e concreções rochosas da costa, como controles entre as demais localidades. Em cada localidade serão avaliados seis setores aleatórios nos quais serão realizados seis censos visuais subaquáticos para avaliação da comunidade de peixes recifais adultos e outros seis específicos para avaliação de recrutas e juvenis de peixes recifais. Nas mesmas localidades serão realizadas saídas específicas para colocação de armadilhas de luz que serão utilizadas para captura de larvas de peixes marinhos. Além disso, duas destas áreas, Parque Nacional Marinho de Abrolhos e recifes do Espírito Santo (localizados em frente à foz do rio São Mateus), serão utilizados para os estudos de movimentação e telemetria.

6.2 Procedimentos de campo e laboratório

* Meta 1 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos (Doce em pequena escala e Piraquê)

Para as coletas padronizadas de peixes, em cada campanha, em cada ponto, serão realizados três

arrastos de cinco minutos cada, utilizando-se redes de arrasto de fundo com portas (semelhantes àquelas empregadas na pesca do camarão da região estudada), operada 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 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, medidos (comprimentos padrão e total - CP e CT) em milímetros com ictiômetro, e pesados (o mais próximo de 0,01g) com balança.

Após os procedimentos de laboratório, alguns exemplares de cada espécie de peixes e crustáceos serão selecionados para serem preservados para eventual tombamento em coleção zoológica, até que se tenha representantes de todas as espécies amostradas.

*** Meta 2 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos**

Para as coletas padronizadas de peixes e crustáceos, em cada campanha, em cada ponto, serão realizados três arrastos de cinco minutos cada, utilizando-se redes de arrasto de fundo com portas (semelhantes àquelas empregadas na pesca do camarão da região estudada), operada 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 acompanhantes serão fotografados, identificados no menor nível taxonômico possível, medidos (com paquímetro digital) quanto ao 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.

*** Meta 3 - Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais**

Meta 3.1 - genética de populações de peixes:

Para a análise da genética de populações de pelo menos 15 espécies de peixes, após a triagem, serão retiradas porções das nadadeiras de, pelo menos 10 exemplares (adultos e/ou juvenis) de cada espécie, ao longo de todo o período estudado. Estas serão conservadas e armazenadas congeladas em frascos plásticos contendo álcool PA, até que sejam processadas.

As extrações de DNA a partir dos tecidos da nadadeira serão feitas segundo o protocolo de Sambrook *et al.* (1989) no qual o tecido é adicionado a uma solução tampão de lise e proteinase K para sua digestão. Posteriormente o DNA será isolado através da precipitação proteica e as impurezas eliminadas com etanol. O DNA será quantificado e terá determinada sua qualidade através de espectrofotômetro de ácidos nucleicos e proteínas.

Três tipos de marcadores moleculares serão utilizados para as análises genéticas. Inicialmente, os marcadores deverão ser desenvolvidos e otimizados para cada espécie. Assim, primeiramente necessitaremos que: i) microssatélites sejam confeccionados especificamente para as espécies de interesse; além do uso adicional de ii) marcadores mitocondriais; e iii) regiões nucleares que serão utilizadas para os estudos de genética populacional. Um mínimo de 10 *loci* deverão ser selecionados para as ampliações do material genético usando marcadores microssatélites.

Meta 3.2 - DNA mitocondrial (*Barcoding*):

Para os estudos de DNA mitocondrial *Barcoding*, porções dos músculos e/ou nadadeiras de 5 exemplares (quando possível) de cada espécie serão removidas, armazenadas em frascos plásticos com álcool 96%, e mantidas congeladas até o processamento. Este procedimento será realizado para todas as espécies coletadas.

Para a análise de DNA mitocondrial *barcoding*, serão sequenciados segmentos parciais do gene mitocondrial COI para cinco indivíduos de todas as espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao

longo do período do monitoramento. Para a amplificação e sequenciamento dos serão utilizados os primers descritos por Ward *et al.* (2005). As sequências obtidas serão submetidas ao banco de dados BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2013) (<http://www.boldsystems.org/>), para verificar a correspondência e similaridade com as sequências armazenadas no banco de dados.

*** Meta 4 - Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos**

Exemplares adultos das espécies selecionadas serão coletados nos quatro estuários, entre a região de água doce e a região marinha utilizando diferentes artes de pesca, sendo 75 indivíduos por estuário (total de 300 amostras). Após a captura 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 removidos cuidadosamente com pinças plásticas para evitar contaminação metálica, limpos de tecidos orgânicos e armazenados em tubos Eppendorf.

As análises químicas elementares serão realizadas para diferentes fases do ciclo de vida dos peixes (do nascimento até a data da coleta), visando compreender o uso das regiões estuarinas contempladas no monitoramento ao longo da vida da espécie. As análises químicas serão realizadas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivo por ablação a laser (ICP-MS-LA). Os otólitos serão limpos dos tecidos orgânicos aderentes, lavados com água ultrapura, secos ao ar e montados em resina epóxi. Posteriormente serão cortados em seções delgadas (200-300 µm). As seções serão posteriormente desbastadas com lixas de carboneto de silício até o plano do núcleo, com a ajuda de um microscópio metalográfico. Serão finalmente polidas com pastas de diamantes e montadas em lâmina de vidro convencional com uma gota de resina epóxi. Após secagem e polimerização da resina, as lâminas serão descontaminadas com água ultrapura durante 3 minutos em ultrassom, lavadas abundantemente com água ultrapura e deixadas secar numa câmara de fluxo laminar. Serão obtidas as leituras de um conjunto de isótopos usualmente informativos nos otólitos (e.g. ^7Li , ^{25}Mg , ^{55}Mn , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{88}Sr , ^{85}Rb , ^{138}Ba , ^{56}Fe e ^{208}Pb) conjuntamente com o cálcio (^{43}Ca), que funciona como um padrão interno. A dimensão do feixe laser será em função da microestrutura dos otólitos e será ajustado com base em análises preliminares. A razão Sr:Ca, indicativa de uso do habitat, será analisada através de um transecto entre o núcleo e a borda do otólito, já a assinatura química, que permitirá diferenciar quimicamente os estuários, irá analisar preferencialmente o núcleo e a borda dos otólitos, que nos dá informação sobre a fase natal (postura, eclosão larval ou berçário) ou de captura do indivíduo, respectivamente.

*** Meta 5 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais**

Para o monitoramento da ictiofauna recifal as áreas amostradas serão classificadas segundo a sua distância da foz do rio Doce, utilizando um desenho de impacto ambiental Beyond-BACI. A avaliação será feita semestralmente, em múltiplas áreas controles e áreas impactadas nas cinco áreas recifais adjacentes ao rio Doce, cuja distância da foz é a menor. Em cada área, seis setores aleatórios serão selecionados, nos quais seis censos visuais serão realizados em cada setor, tendo como unidade amostral os censos visuais. Nestas áreas, o recrutamento de peixes será monitorado por censos específicos para juvenis, em um total de seis censos por área, enquanto o aporte larval será descrito através do emprego de armadilhas de luz, para estimar a chegada de pós-larvas aos ambientes recifais adjacentes às desembocaduras dos rios. Uma vez coletadas e armazenadas em álcool 70%, as larvas serão avaliadas com o uso de um estereoscópio para sua identificação e fotodocumentação para fins de registro visual das espécies amostradas.

Para os censos visuais, a abundância e a estrutura de tamanho dos peixes serão estimadas e as espécies identificadas por mergulhadores treinados e calibrados para as estimativas de tamanho. A abundância será ser registrada em classes, com base em uma escala logarítmica (de base 2) e a estimativa de tamanho em classes de 2 em 2cm.

Metas 6 e 7 - Estudos de telemetria de peixes no estuário do rio Doce e recifes adjacentes

A base do sistema de rastreamento é composta por emissores acústicos e receptores. Os primeiros são pequenos e autossuficientes, não perturbam os movimentos naturais do animal e emitem sinais acústicos singulares e identificáveis, através de frequências de emissão únicas ou pela emissão de pings acústicos codificados. Os receptores, colocados em malhas amostrais ao longo da rota de movimentação dos peixes, registram o sinal acústico. Outras informações ambientais relevantes podem ser adquiridas através de métodos acessórios como coleta de dado *in loco*, imagens de satélites ou observação direta. Transmissores codificados e contínuos, de tecnologia VEMCO serão utilizados em conjunto com receptores submersíveis fixos, modelo VR2W e receptores móveis, modelo VR100. Os transmissores são embalados em cilindros com 9 mm diâmetros, que contém componentes eletrônicos e bateria selada em epóxi para resistir a submersão e a alta pressão. Os receptores VR2W têm canal único com tecnologia Bluetooth® wireless, capazes de identificar os sinais codificados dos transmissores VEMCO. O VR100, vêm acoplado com dois hidrofones, um direcional e um holodirecional, oito canais configuráveis de recepção acústica e são capazes

de interpretar a emissão dos transmissores contínuos ou codificados.

Para os peixes estuarinos/marinhos serão instaladas duas malhas de receptores. O primeiro estará localizado ao longo do estuário do rio Doce e o segundo na região marinha adjacente. Cada conjunto de receptores será composto por 20 receptores fixos VR2W. Os transmissores acústicos serão implantados na cavidade celomática dos peixes, seguindo protocolo já desenvolvido (Hackradt C.W. observação pessoal). A manutenção dos receptores e leitura dos dados será realizada trimestralmente durante o período de monitoramento. Entretanto, varreduras mensais, em áreas de sombra ou descobertas pela malha de receptores serão realizadas com auxílio do VR100 e da telemetria ativa para maior acurácia dos dados obtidos.

Para os peixes recifais, será empregada a mesma metodologia de malha de receptores em duas áreas, no Parque Nacional Marinho de Abrolhos (área controle) e nos recifes do Espírito Santo (aqueles localizados em frente à foz do rio São Mateus; área potencialmente impactada). Cada conjunto de receptores será composto por 30 receptores fixos VR2W. Os transmissores acústicos serão implantados na cavidade celomática dos peixes, seguindo protocolo já desenvolvido (Hackradt C.W. observação pessoal). A manutenção dos receptores e leitura dos dados será realizada trimestralmente durante o período de monitoramento. Na mesma oportunidade do monitoramento, dados complementares serão tomados a partir da telemetria ativa com uso do VR100 para melhor acurácia dos dados.

6.3 Análises de dados

* Meta 2 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos

Será construída a curva do coletor, utilizando-se modelos de ajuste da curva para estimativas da riqueza total, como Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, ACE e ICE, e Bootstrap (Colwell & Coddington, 1994), para peixes e crustáceos separadamente.

Para peixes e crustáceos, em separado, serão calculados a abundância relativa (%) dos exemplares por espécie (número e peso), e os descritores das assembleias como o índice de Diversidade de Shannon-Wiener, Equitatividade, Constância de ocorrência (C) das espécies, índices de Morisita-Horn e Jaccard, e o de Dominância.

Abundância, biomassa e os descritores da assembleia serão testados por PERMANOVA (Anderson *et al.*, 2008), considerando como fatores fixos mês, estação do ano e pontos por estuário. A análise será baseada em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis com 9999 permutações.

Para a descrição das assembleias de peixes e crustáceos, separadamente, visando o ordenamento de pontos segundo a distribuição das espécies, será utilizada a análise de cluster hierárquico (modo normal) utilizando-se para isto, as espécies que representarão no mínimo 1% da abundância numérica (transformada em $\log(x+1)$) de cada estuário. A matriz de similaridade será gerada a partir do índice de similaridade de Bray-Curtis (Ludwig & Reynolds, 1988).

Os dados relativos aos fatores ambientais (salinidade e temperatura) serão submetidos a um modelo de ANOVA fixa.

* Meta 3 - Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

* Meta 3.1 - Genética de populações de peixes

Ao final do período de 16 meses será otimizado o protocolo de extração de DNA para as amostras originárias de 15 espécies de peixes, além de quantificar o DNA em cada amostra. Assim, as melhores amostras servirão de modelo para o desenvolvimento de *locus* de microssatélite que serão otimizados para as espécies em estudo.

Meta 3.2 - DNA mitocondrial (*Barcoding*):

A identificação de Barcode gap e o "*Barcode Index Number*" (Ratnasingham & Hebert, 2013) serão conduzidas por meio do site do *Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>). Adicionalmente será desenvolvida uma biblioteca de DNA *barcodes* para as espécies nativas da região que ainda não possuem a sequência registrada. As sequências obtidas serão depositadas no banco de dados, de forma a serem reconhecidas formalmente como sequências *barcode* das espécies em questão. Para tanto, conterão o nome da espécie, o voucher com os dados de catalogação e instituição de depósito (dados de coleta: nome dos coletores, data e localização com coordenadas geográficas), nome do especialista que identificou a espécie, a sequência da região barcode com pelo menos 500 pb, informações sobre os primers utilizados na amplificação do fragmento de DNA e os respectivos eletroferogramas gerados de ambas as fitas de DNA (Ratnasingham & Hebert, 2007).

*** Meta 4 - Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos**

Para avaliação do uso do habitat através da microquímica do otólito, os dados do perfil da razão Sr:Ca entre o núcleo e a borda do otólito serão comparadas utilizando o pacote *changeoint* (Killick *et al.*, 2016). Diferenças entre comprimento padrão, idade e razões Sr:Ca no centro e nas bordas do otólito serão avaliadas utilizando testes t, se necessário serão transformados para atender os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias (Daros *et al.*, 2016a). A detecção e transformação (i.e. substituição pelo valor extremo mais próximo) de “outliers” será realizada com recurso ao teste de Grubbs. Serão efetuadas análises uni e multivariadas para testar as assinaturas químicas singulares e múltiplas, respetivamente. Será realizada uma análise de variância unifatorial (ANOVA) (fatores: localização ou data captura) seguido, se necessário, por testes à posteriori (teste de Tukey). Análises multivariadas de variância (MANOVA) será também usada para testar diferenças espaciais (e eventualmente temporais) nas assinaturas químicas elementares. Na MANOVA será reportado o parâmetro estatístico Pillai's trace. Comparações post-hoc serão feitas mediante testes de Hotelling T-square. Análises discriminantes lineares (L DFA) ou quadráticas (Q DFA) serão usadas para visualizar e discriminar as diferenças espaciais entre grupos. Matrizes de jackknife serão utilizadas para aferir o sucesso de re-classificação (%) dos indivíduos ao local de captura (Daros *et al.*, 2016b) Todas as análises estatísticas serão realizadas em ambiente R (R Core Team, 2016). Será utilizado o nível de significância de $p < 0,05$ e os dados serão plotados como média \pm desvios padrão.

*** Meta 5 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais**

A avaliação do impacto sobre a abundância e estrutura das assembleias de peixes será realizada através de censos visuais subaquáticos conduzidos através de transecções seguindo um desenho Beyond-BACI (Underwood 1991, 1994).

O desenho amostral Beyond-BACI é do tipo assimétrico, pois não há o mesmo número de níveis para todos os fatores estudados. O fator fixo Impacto (I) apresenta 2 níveis, o primeiro Impacto (I), é o local impactado, próximo a foz do rio Doce e o segundo nível Controle (C) perfaz os locais amostrados longe da foz, mais distantes da área impactada; portanto se faz necessário a criação de um contraste entre os níveis do impacto para a correta avaliação deste fator (I vs. C). Dentro de cada nível do fator I serão estabelecidos seis Setores (S), fator aleatório com 6 níveis, utilizados com o fim de estabelecer réplicas espaciais para o fator estudado, no intuito de aumentar a variabilidade espacial e a potência do desenho aplicado. Em cada setor serão conduzidos seis censos visuais, que serão utilizadas para avaliar a abundância e estrutura da assembleia de peixes. Acoplados aos seis censos, serão realizados outros seis, com menor área amostral, para determinação das abundâncias de juvenis e recrutas das espécies de peixes recifais.

Conjuntamente a identificação da espécie, o observador estimará a abundância da mesma em classes de escala geométrica (cf. Harmelin, 1987; García-Charton & Pérez-Ruzafa, 2001; Hackradt *et al.*, 2011), o comprimento total dos indivíduos será estimado em classes de tamanho de 2 cm (i.e.: Hackradt *et al.*, 2011). Após terminado o percurso de ida, o observador estimará alguns dados abióticos: a) Heterogeneidade - Tipo de substrato (estimando visualmente a % de rocha, % de areia; % de cascalho); b) Cobertura (estimando visualmente % de coral, % de algas, % de Palythoa, % sem cobertura); c) Complexidade (contagem do: número de blocos pequenos, medianos e grandes; e estimativa visual da rugosidade (1 a 4, sendo 1 o terreno liso e 4 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 serão aplicados para controlar a variância entre os censos aplicados.

Os dados de abundância determinados pela CPUE de adultos, juvenis, recrutas e larvas, além de riqueza e diversidade, serão analisados através da análise de variância desbalanceada (ANOVA) (Underwood, 1997; Benedetti-Cecchi, 2001; Glasby, 1997). Diferenças na abundância das espécies de peixes, assim como riqueza específica e diversidade serão testadas frente os fatores de tratamento propostos. O fator fixo Impacto (I) será testado através da comparação de todos os locais controle frente ao local impactado, e também na avaliação dos contrastes de seus níveis - Impacto versus Controle (I vs. C) e dos locais Controle (C) entre si. Adicionalmente, o fator aleatório espacial Setor (S) será testado de forma aninhada ao fator Impacto [S(I)], assim como aos seus contrastes, buscando verificar a consistência do efeito do impacto em diferentes setores. Ele também será testado com seus respectivos contrastes, a fim de controlar a variabilidade ambiental existente a pequena escala.

Segundo Underwood (1997), o efeito do impacto sobre as variáveis resposta da comunidade recifal, será avaliado através da significância do fator impacto, e no contraste entre o impacto e os controles (I vs. C). Adicionalmente, o mesmo também poderá ser detectado, porém diferencialmente para cada setor estudado, através da significância da interação dos fatores S(I) ou S(I vs. C) (Underwood, 1994; Glasby, 1997; Benedetti-Cecchi, 2001).

Metas 6 e 7 - Estudos de telemetria de peixes no estuário do rio Doce e em ambientes recifais

A localização teórica do peixe marcado pode ser estabelecida através de dois métodos: aritmético e harmônico. Como segundo Simpfendorfer *et al.*, (2002) as diferenças entre as abordagens são desprezíveis, utilizaremos o algoritmo de Simpfendorfer a partir da abordagem aritmética. Este método não leva em consideração o raio de detecção dos receptores, porém a zona de amostragem deve estar coberta pela recepção, isto é dizer que os indivíduos detectados estarão constantemente circulando pela área do polígono formado. O cálculo considera que quanto mais um indivíduo se aproximar do receptor, mais será detectado e vice-versa.

Os registros referentes às posições de marcação e as posições teóricas e o tempo de permanência na área de cada animal marcado será confrontado e analisado sob diferentes escalas de tempo (ciclos diários, mensais, etc.) através de estatística básica, utilizando Qui-quadrado (χ^2) e teste t quando possível, para avaliar se há diferenças significativas entre os indivíduos. Estes registros darão base às estimativas de período de atividade, área de vida e área de dispersão individual.

Os dados de posicionamento, as detecções, serão utilizados para calcular a área de vida através de três métodos: polígono convexo mínimo (MCP) que estima a área com base em 100% das detecções; área de vida baseada na densidade de uso de Kernel a 95% (KUD95) e 50% (KUD50) das detecções. Para esta análise se utilizará a estimativa por "Least square cross-validation" que aumenta a resolução da área usada pelo peixe (Seaman & Powell, 1996). As análises serão conduzidas utilizando-se o pacote estatístico R (adehabitat) e as análises espaciais utilizando quantum gis London (QGis v. 1.8).

Modelos lineares generalizados (GLM) serão aplicados com intuito de comparar a distância linear máxima percorrida e o tamanho da área de vida das espécies (todos os métodos) entre as áreas dentro e fora do rio (para espécies estuarino/marinhas) e impacto (recifes do Espírito Santo) e controle (ParNaMar Abrolhos) (para espécies recifais), considerando distintos habitats. Os GLMs são uma extensão dos modelos lineares normais, podendo incluir fatores aleatórios e covariáveis, assegurando flexibilidade estatística (Cordeiro & Demétrio, 2013). Os modelos que melhor explicam as relações de interesse, serão selecionados com base no Akaike Information Criteria (AIC), onde o menor peso (w_i) indica o modelo com melhor balanço entre ajuste e precisão (Burnham & Anderson, 2004).

Os dados de comportamento adquiridos a partir da telemetria acústica (padrão de movimentação em ciclos) será analisada para determinação de síndromes comportamentais nas espécies objeto de estudo. Estes dados serão analisados à luz dos modelos aditivos generalizados (GAM), levando em consideração o habitat e os fatores impacto e controle. O GAM é um modelo linear generalizado no qual o preditor linear depende de funções suaves desconhecidas de alguma(s) variável(is) preditora(s) (Hastie & Tibshirani, 1990). Por essa razão adequados para prever o como se dá o comportamento entre distintas situações de impacto e controle. Visto que parte dos parâmetros de suavização da curva são estimados como ajuste do modelo, o processo de suavização não remove um fator pouco explicativo. Para tal, aplicaremos o AIC como método de seleção dos parâmetros do melhor modelo explicativo, visto que é a técnica com melhor balanço entre ajuste e precisão (Burnham & Anderson, 2004).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M. J.; Gorley, R. N. & Clarke, K. R. 2008. **PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods**. Plymouth, UK: PRIMER-E.
- Benedetti-Cecchi, L.; Pannacciulli, F.; Bulleri, F.; Moschella, P. S.; Airoidi, L.; Relini, G.; Cinelli, F.; 2001. Predicting the consequences of anthropogenic disturbance: large-scale effects of loss of canopy algae on rocky shores. **Marine Ecology Progress Series** v. 214, p. 137–150.
- Burnham, K. P.; Anderson, D. R. 2004. Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. **Sociological Methods & Research** v. 33, p. 261–304
- Colwell, R. K.; Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 345, n. 1311, p. 101-118.
- Cordeiro, G. M. & Demétrio, C. G. B. **Modelos lineares generalizados e extensões**. 483 p. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lce/arquivos/aulas/2013/LCE5868/livro.pdf>
- Daros, F. A.; Spach, H. L.; Correia, A. T. 2016a. Habitat residency and movement patterns of *Centropomus parallelus* juveniles in a subtropical estuarine complex. **Journal of Fish Biology**, p. 1-15.

- Daros, F. A.; Spach, H. L.; Sial, A. N. & Correia, A. T. 2016b. 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** v. 3, p. 262-272.
- García-Charton, J. A. & Pérez-Ruzafa, A. 2001. Spatial pattern and the habitat structure of a Mediterranean rocky reef fish local assemblage. **Marine Biology**, v. 138, p. 917-934
- Glasby, T. M. 1997. Analyzing data from post-impact studies using asymmetrical analyses of variance: a case study of epibiota on marinas. **Australian Journal of Ecology** v. 22, p. 448-459.
- Hackradt, C. W.; Félix-Hackradt, F. C.; García-Charton, J. A. 2011. Influence of habitat structure on fish assemblage of an artificial reef in southern Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 72, p. 235-247.
- Harmelin, J. G. 1987. 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**, v. 8, n. 3, p. 263-284.
- Hastie, T. J. & Tibshirani, R. J. **Generalized additive models**. Chapman and Hall, London, 1990. 335 p.
- Killick, R.; Haynes, K. & Eckley, I. A. 2016. *Changepoint: An R package for changepoint analysis*. R package version 2.2.2, <https://CRAN.R-project.org/package=changept>
- Ludwig, J. A. & Reynolds, J. F. **Statistical ecology**. [S. l.]: John Willey & Sons, 1988. 337 p.
- R Core Team. 2016. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ratnasingham, S.; Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. **PLoS ONE**, v. 8, e66213
- Sambrook, E.; Fritsch, F. & Maniatis, T. **Molecular Cloning**. Cold Spring Harbour press, New York, EEUU. 1989.
- Seaman, D. E. & Powell, R. A. 1996. An evaluation of the accuracy of kernel density estimators for home range analysis. **Ecology**, v. 77, p. 2075-2085.
- Simpfendorfer, C. A.; McAuley, C. R. & Unsworth, P. 2002. Validated age and growth of the dusky shark, *Carcharhinus obscurus*, from Western Australian waters. **Marine and Freshwater Research**, v. 53, p. 567-573.
- Underwood, A. J. 1991. Beyond BACI: Experimental designs for detecting human environmental impacts on temporal variations in natural populations, **Australian Journal of Marine and Freshwater Research** v. 42, p. 569 - 587.
- Underwood, A. J. 1994. On beyond BACI: sampling designs that might reliably detect environmental disturbances, **Ecological Applications** 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, 504 p.
- Ward, R. D.; Zemplak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R. & Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360 n. 1462, p. 1847-1857.
-
-

MONITORAMENTO DA SEDIMENTAÇÃO NO PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS E REGIÕES RELACIONADAS (ANEXO 8)

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Heitor Evangelista da Silva	Doutor II - Coordenador do Anexo 8 Coordenação geral de todas as atividades da parte analítica/mineralógica, sensoriamento remoto e atividades de campo	UERJ
Claudio de Morisson Valeriano	Doutor II - Vice- Coordenador do Anexo 8 Coordenação das atividades relacionadas a análises dos isótopos radiogênicos e mineralogia	UERJ
Gilberto da Silva Vaz	Técnico de Nível Superior Processamento físico e químico das amostras	UERJ
Leonardo Monteiro	Técnico Nível Médio Processamento básico de dados (sensoriamento remoto)	UERJ
Marcela Lobato	Pós Doutorado Acompanhamento das análises em espectrômetro de massa	UERJ
Newton de Magalhães Neto	Pós-Doutorado Processamento e detalhamento das análises por sensoriamento remoto	UERJ
Anna Beatriz Jones Oaquim	Mestre Análise da saúde de corais	UERJ
Carla Cristine de Aguiar Neto	Mestre Análise da saúde de corais	UERJ
Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ
Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ
Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ
Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ/CAP
Iniciação Científica	Pesquisador	UERJ/CAP

2. ESCOPO

O Anexo 8 trata do monitoramento oceânico para a região do Parque Nacional Marinho (PARNAM) dos Abrolhos em vista de sua importância ecológica e do risco potencial de os rejeitos provenientes do rompimento da Barragem de Fundão cheguem ao arquipélago dos Abrolhos. Este monitoramento é proposto para acontecer em duas partes: (1) buscar uma calibração para imagens de satélite (Landsat, Sentinel e MODIS Terra 220 m) para o parâmetro MPS (Material Particulado em Suspensão) e gerar mapas que mostrem a evolução temporal deste parâmetro entre a foz do Rio Doce e Abrolhos); (2) monitorar, em caráter sazonal, o material particulado em suspensão no mar e a sedimentação na região, visando determinar a assinatura geoquímica do material aportado ou ressuspensionado. No que tange a esse material, o objetivo é determinar se os principais contribuintes do material sedimentar encontrado na região provêm da foz do rio Doce, do rejeito proveniente da barragem de Fundão e/ou do estuário de Caravelas (BA). O estudo de sedimentação é considerado fundamental para se caracterizar a existência de impacto na região de Abrolhos pela presença de elementos associados ao rejeito. Por isso, entende-se que este estudo deve preceder os demais monitoramentos e balizar ações futuras. Como o ICMBio mantém programa de monitoramento para avaliação da saúde dos recifes de coral em algumas Unidades de Conservação marinhas, incluindo o PARNAM Abrolhos, seguindo o protocolo Reef Check, este Anexo definiu que este monitoramento deve ser executado em pontos de amostragem já utilizados por aquele monitoramento para permitir a compatibilização de resultados e análises. O estudo prevê a adição de pontos-controle cujo material sedimentar também (ou potencialmente) pode chegar a Abrolhos tal como o material sedimentar do estuário de Caravelas, erosão do próprio recife de corais e seu embasamento vulcânico e materiais aportados pela corrente do Brasil

localizados a norte de Abrolhos. Além disso será feita uma melhor caracterização do Rio Doce e de seu curso impactado.

3. OBJETIVO

Em 5 de novembro de 2015 ocorreu o rompimento da barragem do Fundão, da mineradora Samarco, em Mariana (MG), com o lançamento de 34 milhões de m³ cúbicos de rejeitos no meio ambiente, composta principalmente por óxido de ferro e sílica em uma região de cabeceira da bacia hidrográfica do rio Doce (SIGHR, 2015). A pluma de águas turvas chegou à foz 16 dias após o rompimento da barragem, em 21 novembro e estudos realizados na época demonstraram que a mancha de materiais em suspensão atingiu uma área de aproximadamente sete mil km². A Figura abaixo apresenta imagens de satélite da região da foz do Doce obtidas em diferentes datas, antes e após o evento em Mariana.

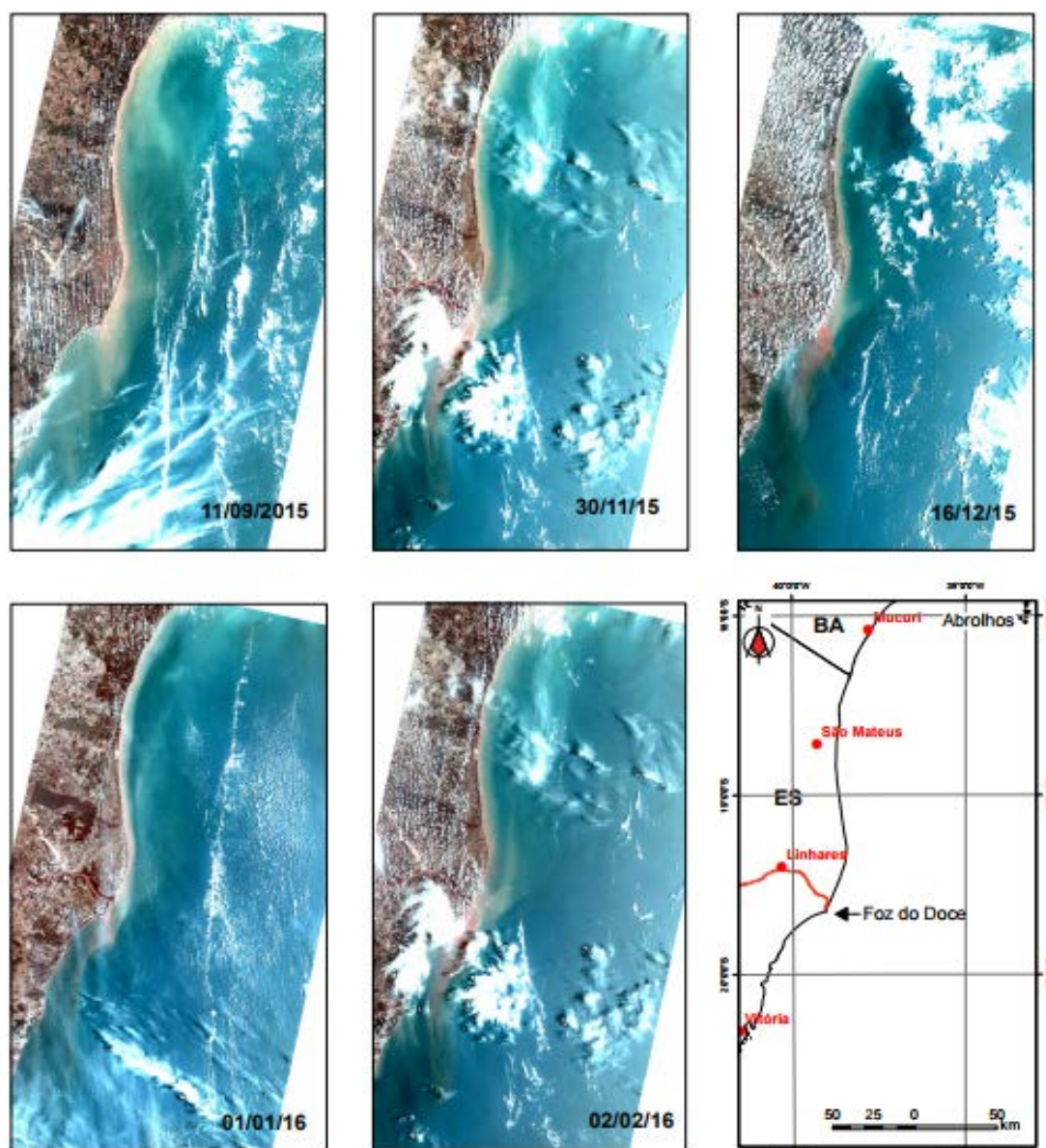


Figura 1 - Série temporal de imagens do satélite Landsat da região da foz do Doce. Fonte: SIGHR, 2015.

Assim, devido à proximidade do rio Doce com o PNM de Abrolhos, e a importância ecológica da referida UC, que é considerada como um refúgio do Pleistoceno, devido às características arcaicas de suas espécies, indicando que a "fauna coralina terciária foi preservada em um refúgio, na costa do Brasil, durante

os níveis baixos do mar no período glacial" (LEÃO,1983), apresenta-se a referida proposta de levantamento e monitoramento. Objetiva-se neste Anexo: (1) definir uma assinatura geoquímica, baseada em isótopos radiogênicos, de origem para a pluma de rejeitos proveniente da barragem de Fundão. Tal objetivo contemplará análise de material sedimentar coletado em Abrolhos, na Foz do Rio Doce em áreas potencialmente contribuintes para o sedimento que chega a Abrolhos; (2) buscar uma calibração de imagem de satélite para o parâmetro MPS entre a Foz do Rio Doce e Abrolhos.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Definição de assinatura geoquímica/(por isótopos radiogênicos) do material de rejeito proveniente da barragem de Fundão na área oceânica

A estratégia metodológica básica adotada por este grupo de trabalho objetiva definir uma assinatura geoquímica de origem para a pluma de sedimentos da lama de rejeitos da Samarco em relação a outras áreas da zona costeira em torno da foz do Rio Doce. 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 outras interferências e fontes do que os elementos químicos como o Fe, Ti e Al. 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 (WALTER et al., 2000; GOLDSTEIN & JACOBSEN, 1988). 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). Análises elementares por MEV+EDS em micropartículas na coluna d'água e no sedimento complementarão o estudo.

Meta 2- Investigação quanto a presença/ausência de micropartículas com enriquecimento anômalo de Fe na coluna d'água

Os dados dos isótopos radiogênicos de certa amostra, é o resultado de um processo de mistura de diversas fontes minerais distintas. Desta forma, para que seja alcançada uma resolução na qual seja observável uma "mudança" na assinatura natural de um conteúdo mineral é necessário que tal mistura ocorra em quantidades mensuráveis. Isto significa que pequenas quantidades da lama de rejeito poderiam ser misturadas as amostras sedimentares de Abrolhos, sem que haja alteração significativa da "assinatura radiogênica". Assim, empregou-se as análises de MEV+EDS, que é uma técnica que investiga as micropartículas de forma individual e desta forma é possível investigar se qualquer resíduo de lama está presente em Abrolhos.

Meta 3- Calibrar imagens de satélite com cobertura espacial Foz do Rio Doce-Abrolhos para o parâmetro MPS

O uso de sensoriamento remoto no mapeamento da concentração de sedimentos em suspensão em estuários é relativamente bem estabelecido para uma variedade de ambientes. Um método clássico é baseado na refletância medida na porção do infravermelho (600-700 nm). Essa abordagem é razoavelmente robusta em águas costeiras e interiores visto que a contribuição dos materiais suspensos na coluna d'água dominam os espectros de reflectância quando comparados por exemplo a absorção pelo fitoplâncton. O MODIS 1 fornece cobertura no espectro infravermelho na banda 620–670 nm com uma sensibilidade suficiente para estudos de águas oceânicas. Dado suas características, sua resolução espacial média (250 m), reflectância na banda infravermelha, alta sensibilidade e cobertura diária, sugerem a adequação de uso para avaliar partículas em suspensão na superfície do mar. Sua validação ocorrerá a partir de medidas in situ por medidas realizadas em sucessivos cruzeiros entre a Foz do Rio Doce e Abrolhos. Esta metodologia é baseada em Miller e McKee (2004; *Remote Sensing of Environment*). Análises empregando imagens LANDSAT e Sentinel também serão realizadas neste estudo.

Meta 4- estabelecer rotina sazonal de monitoramento sedimentar em Abrolhos

Pretende-se neste projeto estabelecer rotinas para armadilhamento de sedimentos em Abrolhos visando as análises específicas do projeto e criar um banco de amostras que será disponibilizado a comunidade científica para outros estudos pertinentes. Serão empregadas técnicas de coleta automática com

resolução mensal de coleta e serão instalados sistemas de integração sazonal do sedimento sendo estes distribuídos em várias localidades de Abrolhos.

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>
Processamento básico de dados para sensoriamento remoto, download de imagens, arquivo digital, implementação de sistema de leitura ótica das amostras	Leonardo Monteiro (Técnico Nível Médio)
Análise da saúde de corais (pré-processamento de amostras de coral)	Anna Beatriz Jones Oaquim (Mestre)
Pré-processamento físico de amostras de sedimentos e corais	Carla Cristine de Aguiar Neto
Apoio a parte analítica e processamento de dados (sub-amostragem de corais para análise elementar)	Mariane Pullig (Iniciação Científica)
Apoio a parte analítica e processamento de dados (sub-amostragem de corais para análise elementar)	Gustavo Abraham (Iniciação Científica)
Apoio a parte analítica (análise de amostras por DRX) e processamento de dados	Andressa Leal (Iniciação Científica)
Apoio a parte analítica em geral	João Coutinho Bachelos (Iniciação Científica)
Processamento físico e químico das amostras	Gilberto da Silva Vaz (Técnico de Nível Superior)

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Identificação de assinatura isotópico para sedimentos coletados em Abrolhos, sensoriamento remoto e logística das atividades de campo	Heitor Evangelista da Silva (Prof. Doutor II - Coordenador do Anexo 8)
Identificação de assinatura isotópica, descrição geológica, mineralogia e contextualização das influências sedimentares em Abrolhos	Claudio de Morisson Valeriano (Prof. Doutor II - Vice- Coordenador do Anexo 8)
Sensoriamento remoto para o parâmetro MPS (acompanhamento temporal)	Newton de Magalhães Neto (Pós-Doutorado)
Controle de qualidade de análises de isótopos radiogênicos	Marcela Lobato (Pós Doutorado)

A análise final terá como uma comparação com dados pretéritos existentes na região de Abrolhos.

6. METODOLOGIA

A Tabela 1 apresenta os pontos de coleta e o que será analisado em cada ponto em relação as análises sedimentares.

para monitoramento da sedimentação no PARNAM de Abrolhos e região

Pontos de Amostragem	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	E	N
Arquipélago dos Abrolhos		
Portinho Sul	531801,78	8013808,42
Língua da Siriba II	530156,14	8013005,57
Parcel dos Abrolhos		
Chapeirão do Pierre	534920,2	8013852,91
Chapeirão da Berna	534785,02	8012257,76
Parcel Coroa Vermelha		
1 - Sul Coroa Vermelha	470464,9	8010444,49
2 - Norte Coroa Vermelha	484376,35	8019762,64
Sul do Arquipélago		
Abrolhos 1	532581,37	8009234,23
Abrolhos 2	533965,89	8010645,59
Arco Interno de Abrolhos		
Viçosa	472709,66	8010686,73
Coroa Vermelha	478706,48	8012876,15
Pontos-controle		
Recife de Fora	501511	8187064,06
Coroa Alta	508907,42	8211551,77

NOTA:

EM VERDE: COLETA DE ÁGUA DE SUPERFÍCIE

EM AMARELO: COLETA DE ÁGUA DE SUPERFÍCIE + ESTAÇÕES DE SEDIMENTOLOGIA

6.1. Micro-análise por MEV+EDS

Para a análise morfológica e elementar das micropartículas para sedimentos finos, será empregado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) modelo Spectroscopy Si/Li Oxford instalado e operacional na Uerj. A imagem obtida pelo MEV é gerada por elétrons secundários gerados como resultado da interação de um feixe de elétrons incidentes com a superfície de uma micropartícula selecionada em seu campo de visão. A composição elementar das partículas foi obtida a partir da análise do espectro gerado pela detecção dos raios-X produzidos pela interação do feixe de elétrons incidentes sobre a superfície da partícula. Cada elemento produz raios-X em faixas de energia específicas, de tal maneira que a análise elementar se torna possível para a identificação de elementos com número atômico superior a 10 ($Z > 10$). Esta técnica permite que a análise elementar seja feita de forma pontual ou por uma área determinada, de acordo com a abertura utilizada para incidência do feixe de elétrons sobre a amostra. Neste método, alvos foram confeccionados com diâmetros de aproximadamente 1 cm contendo material particulado. Tais alvos foram previamente investigados ao MEV para se selecionar partículas com morfologias predominantes, sobre as quais foram realizadas as microanálises elementares. Para tal, nesta abordagem preliminar, foram selecionadas um total de 9 partículas, onde se determinou as abundâncias relativas de C, O, Si, Al, Fe, Ti, Ca, Cl, Zn, Cu, K, Mg e Na. Considerando que o substrato para as análises de EDS é um policarbonato, os valores de abundância relativa destes elementos foram corrigidos para a exclusão de C nas amostras. Nesta técnica, se obtêm dados de abundâncias relativas para micro-partículas escolhidas nas amostras.

6.2. Análise de isótopos radiogênicos

O Samário (Sm) e o Neodímio (Nd) são ETR (Elementos terras raras) leves do grupo dos lantanídeos. Ocorrem como elementos-traço nos minerais formadores de rocha. A concentração de ambos em silicatos cresce na medida que a cristalização do magma evolui. Nas rochas ígneas, a concentração é proporcional com o grau de diferenciação magmática (FAURE, 1986). O elemento estrôncio (Sr) está presente como traço (medido em ppm) na maioria das rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, entretanto a concentração desse elemento raramente ultrapassa a 1%. O Sr participa na formação do carbonato estroncionita e do sulfato celestita, os quais são encontrados em alterações hidrotermais e rochas sedimentares como nos carbonatos (GERALDES, 2010). O elemento Sr pode formar diversos minerais próprios, dos quais somente a estroncionita (SrCO_3) e a celestita (SrSO_4) tem abundâncias significativas. O Sr apresenta quatro isótopos de ocorrência natural: ^{84}Sr , ^{86}Sr e ^{88}Sr (não radiogênicos) e ^{87}Sr (radiogênico). 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.

Para a realização das análises isotópicas é necessário ter cuidados muito especiais nas diversas etapas do processo analítico. Por se tratar de ETR os procedimentos foram conduzidos em sala limpa classe 100 e os ácidos e água utilizados são todos bidestilados em equipamento de purificação por destilação *sub-boiling* para obtenção de reagentes de alta pureza. As amostras foram submetidas a secagem em estufa por 3 dias a 60°C . A seguir o material é quarteado e peneirado em malha de #200 (0,074mm). A fração fina é submetida a digestão ácida a partir da técnica já estabelecida por GIOIA (2010). Após esta etapa iniciou-se os procedimentos para separação de Sr e ETR em colunas com resinas de troca iônica, primárias para separação de Sr e ETR, e secundárias para a separação de Nd.

Os resíduos provenientes da separação de Sr e Nd foram depositados em filamentos de rênio para determinação das razões isotópicas em um espectrômetro de massa multicoletor por ionização térmica (TIMS) TRITON - Thermo Finnigan. A espectrometria baseia-se na ionização de amostras por meio térmico através de uma injeção corrente elétrica em que os feixes de íons produzido são focalizados e acelerados por uma diferença de potencial para atravessar um campo magnético e são separados por suas diferenças de massa criando uma trajetória individual para serem coletados por copos Faraday e contadores de íons (SEM e MIC). Todas as análises são realizadas utilizando o arranjo de filamento duplo devido à grande facilidade do Nd e Sr serem oxidados. Com isso o filamento de ionização é aquecido a uma elevada corrente para dissociar molécula de oxigênio garantindo a medida dos isótopos de Nd sob a forma de metal.

A interpretação dos dados dos isótopos radiogênicos é baseada num diagrama formada pela razão isotópica de neodímio no eixo-Y e pela razão isotópica de estrôncio no eixo-X. Cada grupo mineral ocupa um setor dentro de tal diagrama e desta forma pode-se avaliar se uma determinada amostra tem suas razões isotópicas inseridas em algum domínio específico formado por potenciais contribuintes.

6.3. Razão elementar Fe/Mn

A composição mineralógica dos rejeitos do beneficiamento do minério de ferro é essencialmente sílica (quartzo), óxidos de ferro (hematita FeO e magnetita Fe_2O_3) e argilominerais. Outras substâncias minerais podem ter sido arrastadas do entorno dos leitos pela corrente formada, além do acréscimo de elementos ou substâncias as mais variadas, incluindo metais pesados, que já contaminavam o leito dos rios (e a água) - boa parte dos esgotos das cidades são despejados sem tratamento, além dos produtos químicos utilizados normalmente na agricultura (fertilizantes NPK). A caracterização química dos rejeitos do beneficiamento do minério na mina vizinha da Samarco (Alegria) mostra apenas traços de Zn, Cu e Pb. O metal predominante é Fe, com cerca de 50%, seguido de Mn (um associado do Ferro nas formações ferríferas) com aproximadamente 20%, presentes na forma de óxidos.

Com a colaboração do Projeto Coral Vivo (amostragem de água do mar) e da FURG (análise elementar global), a Uerj foi possível até aqui obter uma compilação das razões Fe:Mn na fração dissolvida da água do mar. Tais análises referem-se a campanha de Janeiro de 2016. Esta razão foi escolhida por se tratar dos elementos majoritários presentes no minério da Samarco (com exceção do Si) e por terem padrões de solubilidade diferenciados. A determinação dos metais foi realizada por ICP-OES (Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado). Estes dados possibilitaram uma comparação direta com as medidas deste mesmo parâmetro realizadas pela CPRM no Rio Doce antes e após o acidente de Mariana. O resultado da comparação evidenciou que as razões Fe:Mn para a lama de minério da Samarco é significativamente menor, com pico em torno de 0,5, comparada com as razões dos sedimentos em Abrolhos com valores entre 50 e 100, Figura 2. Desta forma, esta razão mostrou-se potencialmente boa para a monitoração em Abrolhos e investigar o aporte de material da foz do Rio Doce. A continuidade do projeto permitirá um banco de dados mais robusto e utilizar as razões Fe:Mn como um potencial indicador do material de rejeito nas águas costeiras.

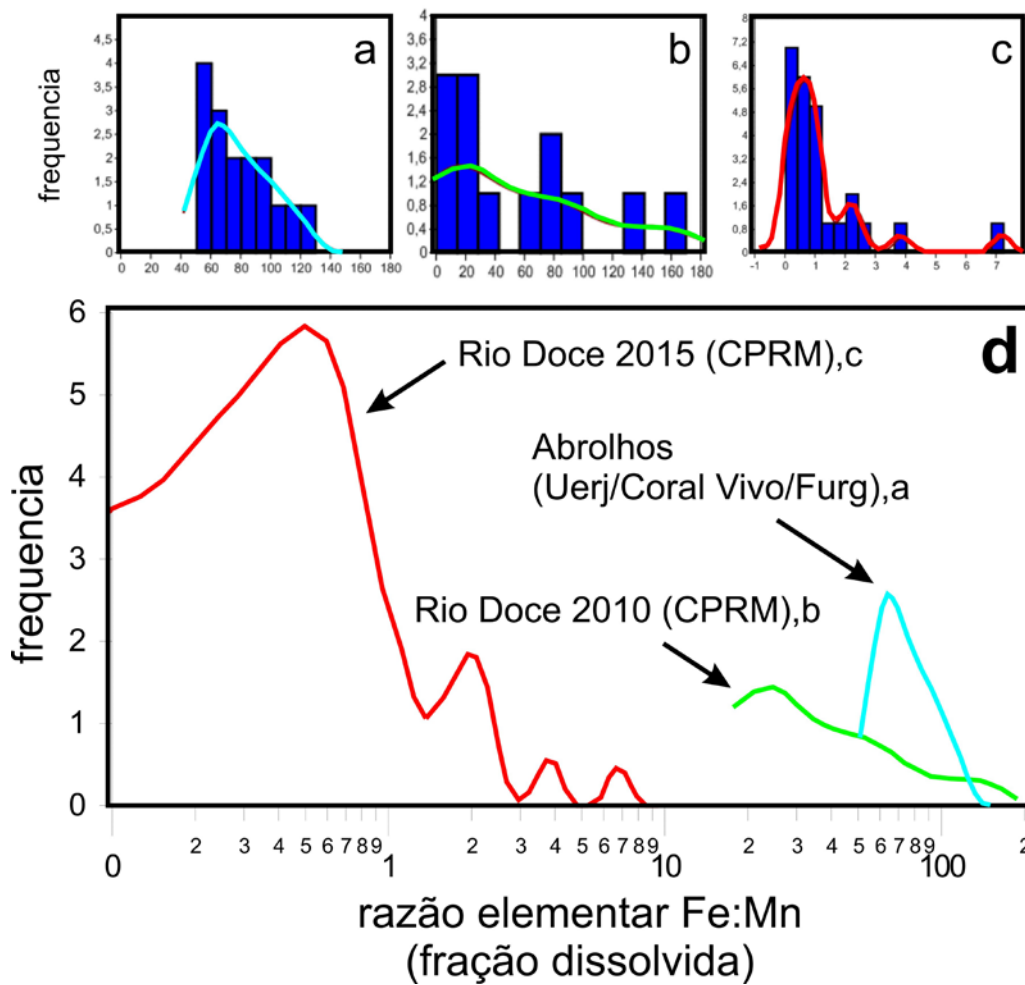
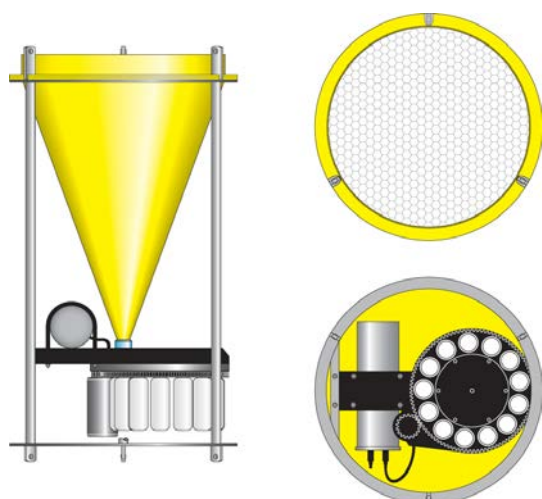


Figura 2 - Razões elementares de Fe:Mn (fração dissolvida) para amostras da Bacia do Rio Doce e Abrolhos-BA.

6.4. Monitoramento sedimentológico

Serão empregadas técnicas de armadilhamento de sedimentos em Abrolhos visando as análises específicas do projeto. Serão empregadas técnicas de coleta automática com resolução mensal a partir de um sistema de roseta a ser instalado próximo ao substrato recifal (Figura 3) e armadilhas convencionais para integração sazonal do sedimento sendo estes distribuídos em várias localidades de Abrolhos. Será também testado um sistema com bóia de fundeio com 4 armadilhas dispostas verticalmente na coluna d'água em profundidades equidistante dentro de uma profundidade total de 20 m. Para um acompanhamento contínuo da variabilidade da turbidez, será instalado um CTD com turbidímetro em uma estação em Abrolhos, a ser definida.



as.



Figura 3 - Sistemas de amostragem sedimentar a serem empregados no projeto. Acima, armadilhas de sedimentos para integração sazonal; abaixo sistema de troca mensal automática.

7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

ANDRONIKOV, A. V. et al. Sm-Nd and Rb-Sr isotopic systematics of the East Antarctic Manning Massif alkaline trachybasalts and the development of the mantle beneath the Lambert-Amery rift. *Mineralogy and Petrology*, v. 63, p. 243-261, 1998.

BASU, A. R. et al. Nd, Sr-isotopic provenance and trace element geochemistry of Amazonian foreland basin fluvial sands, Bolivia and Peru: implications for ensialic Andean orogeny. *Earth and Planetary Science Letters*, n. 100, p. 1-17, 1990.

CARLSON, R. W. et al. Chemical and isotopic relationships between peridotite xenoliths and mafic-ultrapotassic rocks from Southern Brazil. *Chemical Geology*, v. 242, p. 415-434, 2007.

DAMMSHÄUSER A. et al. Atmospheric supply of Al, Fe and Ti to the Atlantic Ocean. *Geophysical Research Abstracts*, v. 13, p. EGU2011-10076, 2011.

DECKART, K. et al. Geochemistry and Sr, Nd, Pb isotopic composition of the Central Atlantic Magmatic Province (CAMP) in Guyana and Guinea. *Lithos*, v. 82, p. 289-314, February 2005.

- FAURE G. 1986. Principles of Isotope Geology. John Wiley & Sons, United States, 588 pp
- FAURE G. Principles of Isotope Geology. John Wiley & Sons, United States, p.588, 1986
- FERREIRA, V. P. et al. Contrasting sources and P-T crystallization conditions of epidote-bearing granitic rocks, northeastern Brazil: O, Sr, and Nd isotopes. Lithos, v. 121, p. 189-201, 2011.
- GAUDETTE, H. E. et al. Geochronology of Precambrian rocks from the northern part of the Guiana Shield, State of Roraima, Brazil. Journal of South American Earth Science, Vol. 9, Nos 3/4, p. 183-195, 1996.
- GERALDES M. C. Introdução à Geocronologia. Sociedade Brasileira de Geociências, São Paulo, p. 146, 2010
- GIRARD, V. A. V. et al. Sr Nd constraints and trace-elements geochemistry of selected Paleo and Mesoproterozoic mafic dikes and related intrusions from the South American Platform: Insights into their mantle sources and geodynamic implications. Journal of South American Earth Sciences, v. 41, p. 65-82, 2013.
- GOLDSTEIN, S.J.; Jacobsen, S.B. Nd and Sr isotopic systematics of river suspended material: implications for crustal evolution. Earth Planet. Sci. Lett, v. 87, p. 249–265, 1988
- GORRING, M. L. et al. Mantle processes of sources of neogene slab window magmas from Southern Patagonia, Argentina. Journal of Petrology, v. 42, n. 6, p. 1067-1094, 2001.
- GUARINO et al. U–Pb ages, Sr–Nd- isotope geochemistry, and petrogenesis of kimberlites, kamafugites and phlogopite-picrites of the Alto Paranaíba Igneous Province, Brazil. Chemical Geology. v.353, p. 65-82, 2013.
- HAMMER, O. et al. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica.v. 4, n.1, p 178, 2001.
- IACUMIN, M. et al. Early proterozoic calc-alkaline and middle proterozoic tholeiitic dyke swarms from central-eastern Argentina: Petrology, geochemistry, Sr-Nd isotopes and tectonic implications. . Journal of Petrology, v. 42, n. 11, p. 2109-2143, 2001.
- JAMBERS W. et al. Characterization of Particulate matter from the Kara Sea using electron probe X-ray micro analysis. Physicochemical and Engineering Aspects. v.120, p. 61-75, 1997.
- NETO, C.C.A. et al. Composição Isotópica do Sr no Padrão NBS987 e nos Padrões de Rocha do USGS BCR-1, AGV-1, G-2 E GSP-1: Resultados preliminares obtidos por TIMS no Laboratório de Geocronologia e Isótopos Radiogênicos – LAGIR – UERJ, Rio de Janeiro. Simpósio 45 anos de Geocronologia no Brasil – CPGeo- IGc – USP. Boletim de Resumos Expandidos, p. 72-74, 2009
- PARADA, M. A. et al. Multiple sources for the Coastal Batholith of central Chile (31–34°S): geochemical and Sr–Nd isotopic evidence and tectonic implications. Lithos, v. 46, p. 505-521, 1999.
- PIMENTEL, M. M. et al. Shrimp U-Pb age and Sr-Nd isotopes of the Morro do Baú mafic intrusion: implications for the evolution of the Arenópolis volcano-sedimentary sequence, Goiás Magmatic Arc. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, v. 75, n. 3, p. 331-339, 2003.
- ROCHA-JÚNIOR, E. R. V. Sr-Nd-Pb isotopic constraints on the nature of the mantle sources involved in the genesis of the high-Ti tholeiites from northern Paraná Continental Flood Basalts (Brazil). Journal of South American Earth Sciences, v. 46, p. 9-25, March 2013.
- SILVA, D. R. A. et al. Whole-rock geochemistry and Sr e Nd isotopic composition of the pre-rift sequence of the Camamu Basin, northeastern Brazil. Journal of South American Earth Sciences, n. 39, p. 59-71, 2012.
- VALERIANO C.M. et al. A new TIMS laboratory under construction in Rio de Janeiro, Brazil. In: IV South American Symposium on Isotope Geology, Salvador. Short Papers IV South American Symposium on Isotope Geology. Salvador,v. 1, p. 131-133, 2003

YOUNG, D. N. et al. Geochemical and Sr-Nd isotopic mapping of source provinces for the Mawson charnockites, east Antarctica: implications for Proterozoic tectonics and Gondwana reconstruction. *Precambrian Research*, v. 86, p. 1-19, 1997.

WALTER, A. V. et al. Rare-earth elements and isotopes (Sr, Nd, O, C) in minerals from the Juquiti carbonatite (Brazil): tracers of a multistage evolution. *Chemical Geology*, n. 120 p. 27-44, 1995.

WALTER, H. J. W. et al. Provenance and transport of terrigenous sediment in the South Atlantic Ocean and their relations to glacial and interglacial cycles : Nd and Sr isotopic evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 64 n. 22, p. 3813–3827, 2000.