



FUNDAÇÃO  
**renova**

**PLANO DE TRABALHO - ATENDIMENTO À DELIBERAÇÃO CIF Nº 212/2018**

**Outubro/2018**

**ATENDIMENTO À DELIBERAÇÃO CIF Nº 212/2018**

**PLANO DE TRABALHO**

## RESUMO

Neste Plano são apresentadas as metodologias a serem utilizadas para cumprimento da Cláusula 165 do TTAC, apenas para porção mineira do Rio Doce, em atendimento à Deliberação nº 212 do Comitê Interfederativo (CIF), de 28 de setembro de 2018. O Plano de Trabalho segue as diretrizes do Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4). O TR4 é bastante abrangente em seu conteúdo, apresentando oito anexos que tratam de diferentes linhas de estudo para monitoramento da biodiversidade aquática nos ambientes dulcícolas, manguezais, praias e áreas de foz, estuarinas e marinhas. No entanto, apenas os Anexos 1, 2 e 3 tratam da investigação no ambiente aquático continental e, por isso, são abordados neste documento.

Palavras-chave: biodiversidade aquática, rio Doce, ambientes dulcícolas, análises, monitoramento.

---

### EQUIPE TÉCNICA RESPONSÁVEL POR ESTE PLANO DE TRABALHO

---

<b>Profissional</b>	<b>Formação, Cargo/Função</b>	<b>Atividades</b>
Bruno Vergueiro Silva Pimenta	Biólogo, Doutor em Zoologia, Líder de Programas Socioambientais	Elaboração do Plano de Trabalho
Laila Carine Campos Medeiros	Bióloga, Doutora em Ecologia de Ecossistemas, Analista de Programas Socioambientais	Elaboração do Plano de Trabalho
Sara Juarez Sales	Engenheira Agrônoma, Gerente Executiva de Programas Socioambientais	Coordenação do Plano de Trabalho

---



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

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

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



<b>ANOTAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA - ART</b>			1-ART N° <b>2-23702/17-E</b>		
<b>CONTRATADO</b>					
2. Nome: LAILA CARINE CAMPOS MEDEIROS			3. Registro no CRBio-02: 78002		
4. CPF: 11950964701		5. E-mail: lailamsv@gmail.com		6. Tel: (027) 30634276 / (027) 99731-3121	
7. End.: RUA CEARÁ 332 APT 103 EDF VILA MARFIM			8. Bairro: PRAIA DA COSTA		
9. Cidade: VILA VELHA		10. UF: ES		11. Cep: 29101290	
<b>CONTRATANTE</b>					
12. Nome: FUNDAÇÃO RENOVA			13. Registro Profissional: 0		
14. CPF/CNPJ: 25135507000183			15. End. AV. GETÚLIO VARGAS 671 SALA 400		
16. Tel / E-mail: (031)32899889 / ouvidoria@fundacaorenova.org		17. Bairro: SAVASSI		18. Cidade: BELO HORIZONTE	
19. UF: MG		20. CEP: 30112021			
<b>DADOS DA ATIVIDADE PROFISSIONAL</b>					
21.1 Natureza:			21.2 Ocupação de Cargo/Função: a - Cargo/função técnica		
22. Identificação: ANALISTA DE PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS					
23. Localização Geográfica: 23.1- do Trabalho: ES 23.2 - da Sede: MG			24 - UF: ES		
25. Forma de participação: Individual			26. Perfil da equipe: N/D		
27. Área do Conhecimento: Ecologia ECOTOXICOLOGIA			28. Campo de Atuação: Meio Ambiente e Biodiversidade Biomonitoramento		
29. Descrição Sumária: GERIR E EXECUTAR AS MEDIDAS PREVISTAS NOS PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS EM DECORRÊNCIA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO, AO LONGO DE TODA ÁREA AFETADA. COLETAR AMOSTRAS AMBIENTAIS, ATUAR COMO GESTORA DE CONTRATOS, ANALISAR E ELABORAR DOCUMENTOS TÉCNICOS, PARTICIPAR DE DISCUSSÕES COM ÓRGÃOS AMBIENTAIS, CONSELHOS CONSULTIVOS E COLEGIADOS, FORNECEDORES E DEMAIS ATORES ENVOLVIDOS.					
30. Valor: R\$ 0,00		31. Total de horas: 170		32. Início: 20/11/2017 00:00:00	
33. Término:					
34. ASSINATURAS			35. CARIMBO DO CRBio:		
Declaro serem verdadeiras as informações acima.			Para autenticação da ART: <a href="http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx">http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx</a> código <b>2017080111131623702</b>		
Data: 20/01/2017 <i>Laila C. C. Medeiros</i> Assinatura do Profissional		Data: / / <i>W. Aguiar</i> Assinatura e Carimbo do Contratante			
36. SOLICITAÇÃO DE BAIXA POR CONCLUSÃO Declaramos a conclusão do trabalho anotado na presente ART, razão pela qual solicitamos a devida BAIXA junto aos arquivos do CRBio-02.			37. SOLICITAÇÃO DE BAIXA POR DISTRATO		
Data: / /		Assinatura do Profissional		Data: / /	
Data: / /		Assinatura e Carimbo do Contratante		Data: / /	
Para autenticação do conteúdo acesse: <a href="http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx">http://www.crbio02.gov.br/autentica.aspx</a> e informe o código <b>2017080111131623702</b> Nº Boleta Gerada 28078380000010698   Situação da ART: Aguardando Pagamento Esta ART deve sempre ser acompanhada do recibo de pagamento do respectivo emolumento de emissão					
ART Eletrônica emitida em 1/8/2017 11:13:16 Impressão efetuada em 1/8/2017 12:22:07					

## SUMÁRIO

<b>1. SUMÁRIO EXECUTIVO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>3. PREMISSAS .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Coletas e Amostras .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Prazos e Produtos .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3 Recebimento, Armazenamento e Distribuição dos Dados .....</b>	<b>9</b>
<b>4. DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1 Item 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas. ....</b>	<b>11</b>
<b>4.1.1 Objetivos .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1.2 Área de Estudo .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1.3 Metodologias e Periodicidade.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Item 2 - Estudo e monitoramento do ambiente dulcícola da Área Ambiental I .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.1 Objetivos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.2 Área de Estudo .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.3 Metodologias e Periodicidade.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Item 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce (Área Ambiental 1) .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.1 Objetivo .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.2 Área de Estudo .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.3 Metodologias e Periodicidade.....</b>	<b>41</b>
<b>5. CRONOGRAMA E EQUIPE EXECUTORA .....</b>	<b>66</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>

## 1. SUMÁRIO EXECUTIVO

O presente Plano de Trabalho foi produzido pela FUNDAÇÃO RENOVA em atendimento à Deliberação nº 212 do Comitê Interfederativo (CIF), de 28 de setembro de 2018, com o objetivo de apresentar as metodologias propostas para execução dos monitoramentos da Biodiversidade Aquática (Cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta - TTAC) no estado de Minas Gerais. Estas atividades são descritas nos Anexos 1, 2 e 3 do Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4), emitido pela Câmara Técnica de Conservação e Biodiversidade (CTBio) em outubro de 2016.

A referida Deliberação determina que a FUNDAÇÃO RENOVA mobilize imediatamente a Rede Rio Doce Mar (RRDM) para executar o monitoramento previsto na Cláusula 165 do TTAC no território do Estado de Minas Gerais e apresente um Plano de Trabalho para estes estudos, sem prejuízo aos estudos já iniciados na porção do baixo Rio Doce e zona costeira. Este arranjo deve perdurar até que se tenha o pleno atendimento da Deliberação nº 113, de 26 de setembro de 2017, que determina à FUNDAÇÃO RENOVA que execute os estudos previstos na Cláusula 165 em Minas Gerais por meio de pesquisas científicas independentes a serem selecionadas por ampla concorrência arbitrada por pares, por meio da publicação de chamada para pesquisas conduzida pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ressalta-se que este Plano de Trabalho descreve parte das ações descritas nos Anexos 1, 2 e 3 do TR4 por se tratarem dos estudos necessários para monitoramento da biodiversidade na porção mineira do Rio Doce. O TR4 e seus oito anexos são bem abrangentes, tratando também de diferentes linhas de estudo para monitoramento da biodiversidade aquática nos ambientes de manguezais, praias e áreas de foz, estuarinas e marinhas. O escopo dos demais anexos está em execução por meio de Acordo de Cooperação Técnica firmado entre a FUNDAÇÃO RENOVA, a Fundação Espírito-Santense de Tecnologia (FEST) e a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Este acordo prevê o apoio ao projeto de pesquisa intitulado “Rede Rio Doce Mar” (RRDM).

## 2. APRESENTAÇÃO

Neste Plano são descritas as metodologias a serem utilizadas para cumprimento da Cláusula 165 do TTAC em Minas Gerais, em acordo com o TR4. O termo mencionado foi elaborado pela CTBio e recebido pela FUNDAÇÃO RENOVA em 20/10/2016. O TR4 é bastante abrangente em seu conteúdo: apresenta oito anexos que tratam de diferentes linhas de estudo para monitoramento da biodiversidade aquática, análises ecotoxicológicas e de bioacumulação e de qualidade de água e sedimentos. Para atendimento à Deliberação nº 212 do Comitê Interfederativo (CIF), de 28 de setembro de 2018, este Plano de Trabalho seguiu as orientações apresentadas apenas nos Anexos 1, 2 e 3 do TR4, que abordam os estudos associados a ambientes aquáticos continentais.

Como forma de facilitar a análise, este Plano de Trabalho segue o ordenamento visto a seguir:

- a) Item 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas (Anexo 1).
- b) Item 2 - Estudo e Monitoramento do Ambiente Dulcícola da Área Ambiental I (Anexo 2).
- c) Item 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce (Área Ambiental 1) (Anexo 3).
- d) Cronograma de Execução e Equipe Executora.

Os estudos propostos neste plano terão duração necessária até que se iniciem as pesquisas científicas selecionadas pela chamada da FAPEMIG, conforme determinado pela Deliberação CIF nº 212.

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

### **3. PREMISSAS**

#### **3.1 Coletas e Amostras**

Conforme solicitação do TR4, os organismos coletados serão tombados em coleções de referência, preferencialmente de instituições de Minas Gerais ou Espírito Santo. O tombamento dos exemplares deve ser feito acompanhado de informações sobre local de coleta (com as devidas coordenadas em UTM, *datum* SIRGAS2000), data de coleta, nome do coletor, método de coleta e outras observações relevantes. Para a obtenção de licenças ou autorizações de captura, coleta e transporte de material botânico ou zoológico, será apresentada ao órgão responsável carta de aceite da instituição depositária, explicitando a capacidade para recebimento e guarda do material em condições adequadas e disponibilizando sua consulta aos pesquisadores interessados, de forma que seja montado acervo capaz de atender a outros estudos pelo maior período de tempo que a preservação do material permitir.

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

#### **3.2 Prazos e Produtos**

Conforme preâmbulo da Deliberação CIF nº 212, os monitoramentos a serem conduzidos pela FEST/UFES-RRDM na porção mineira da bacia do rio Doce irão durar “*até que o acordo com a FAPEMIG seja efetivamente viabilizado*”. Isto pode resultar em dois cenários:

- Cenário 1: caso os projetos selecionados pela FAPEMIG e contratados pela FUNDAÇÃO RENOVA sejam iniciados no meio do período seco de 2019 e a RRDM interrompa suas atividades, a possibilidade de comparação entre os dados coletados por esta última e pelos projetos FAPEMIG será limitada. Isto ocorre pela eventual diferença entre as metodologias a serem utilizadas pelos dois monitoramentos. Dessa maneira, os dados coletados pela RRDM na estação chuvosa 2018-2019 e em parte da estação seca

de 2019 não poderiam ser integralmente comparados com os dados coletados pelos projetos FAPEMIG na outra parte da estação seca de 2019.

- Cenário 2: Caso se opte pela não interrupção das atividades da RRDM para que se construa conjunto de dados comparáveis entre as estações chuvosa e seca, haverá sobreposição entre os monitoramentos conduzidos pelos projetos FAPEMIG e pela RRDM.

Nestes dois cenários, nota-se a destinação de recursos para a construção de conjuntos de dados que podem se resultar conflitantes ou redundantes.

Durante o período, devem ser entregues relatórios semestrais para cada componente do Programa. Após a entrega destes relatórios, será promovido um *workshop* para avaliação técnico-científica dos resultados, que preferencialmente deverão ocorrer junto à apresentação dos estudos realizados na porção continental capixaba e marinha, conforme prevê o TR4. A coordenação dos *workshops*, ainda conforme determinação do TR4, ficará a cargo do ICMBio em articulação com os demais órgãos ambientais.

### **3.3 Recebimento, Armazenamento e Distribuição dos Dados**

O TR4 define que os dados brutos de todas as análises a serem realizadas por este Programa de Monitoramento devem ser enviados ao CIF, ICMBio, IBAMA e às Secretarias Estaduais de Meio Ambiente dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Os dados brutos serão armazenados e disponibilizados pela FUNDAÇÃO RENOVA em um banco de dados aberto a ser elaborado em atendimento às diretrizes apresentadas pela CTBio e Câmara Técnica de Restauração Florestal e Produção de Água (CTFLOR). Este banco está em estudo pela Fundação e irá conter não só os dados referentes à Cláusula 165, mas também aqueles dos estudos relacionados às Cláusulas 164, 166 e 181. Até que esta etapa de desenvolvimento do Banco de Dados seja concluída, as informações geradas pelo Programa de Monitoramento serão disponibilizadas no sistema *WebGis* já em operação na FUNDAÇÃO RENOVA.

Os dados gerados serão entregues conforme periodicidade de coleta, análise e tabulação. No entanto, é reservado ao CIF e seus órgãos integrantes a prerrogativa de solicitá-los a qualquer momento, mediante pedido formal à FUNDAÇÃO RENOVA, qualquer que seja o estágio de desenvolvimento em que estiverem em planilhas Excel, csv ou outros formatos.

Os dados de ocorrência de espécies serão estruturados segundo versão mais recente do padrão Darwin Core. Os dados ecológicos, por sua vez, devem ser estruturados conforme versão mais recente do padrão Metacat.

## 4. DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO

### 4.1 Item 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas.

#### 4.1.1 Objetivos

- a) Investigação dos efeitos causados pela exposição crônica e aguda ao sedimento e à água de regiões dulcícolas, através de testes de toxicidade em laboratório usando organismos como bioindicadores;
- b) Avaliação das concentrações de metais na água e em organismos aquáticos de diferentes níveis da cadeia trófica;
- c) Análise de biomarcadores de exposição e efeito de metais em organismos aquáticos de diferentes níveis da cadeia trófica;
- d) Avaliação da microbiota e detecção de bioindicadores de impactos ambientais no sedimento.

#### 4.1.2 Área de Estudo

No presente Plano de Trabalho serão considerados somente os pontos amostrais localizados na porção mineira da bacia do rio Doce. O Quadro 1 apresenta os pontos amostrais sugeridos para coleta de amostras de água, sedimento e organismos.

**Quadro 1** - Pontos de amostragem em Minas Gerais.

Ponto	Local	Coordenadas (UTM)	
		X	Y
1	Rio Gualaxo do Norte	664079,52	7757121,63
2	Rio Gualaxo do Norte	682785,44	7753970,93
3	Rio Carmo	697075,96	7749043,66
4	Rio Piranga	708502,87	7738550,64

Ponto	Local	Coordenadas (UTM)	
		X	Y
5	Rio Doce	720920,02	7759129,60
6	Rio Casca	746093,27	7771586,91
7	Rio Matipó	763939,00	7788283,09
8	Rio Doce	764470,30	7814492,62
9	Rio Piracicaba	731304,12	7829450,00
10	Rio Santo Antônio	752326,88	7882583,07
11	Rio Corrente	796923,98	7896732,62
12	Rio Doce	814094,03	7904384,41
13	Rio Suaçuí Grande	204368,42	7933691,34
14	Rio Caratinga	222674,95	7875708,57
15	Rio Doce	262586,51	7864629,05
16	Rio Manhuaçu	273539,47	7843227,99

As análises ecotoxicológicas da avifauna, mastofauna e herpetofauna na porção mineira estão sendo feitas no âmbito da Notificação IBAMA 678322-E, que teve sua malha de amostragem proposta pelo Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO. Este monitoramento de fauna e flora terrestre foi conjugado à Cláusula 168 do TTAC por meio da Deliberação nº 91 do CIF.

#### 4.1.3 Metodologias e Periodicidade

O monitoramento ecotoxicológico terá periodicidade sazonal (verão e inverno) em função da hidrodinâmica na região.

- Amostras de água

Serão coletadas amostras de água em 16 pontos na porção mineira da bacia do rio Doce, conforme Quadro 1. Em todos estes pontos deverão ser obtidas três amostras de superfície (0 a 15 cm de profundidade) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo, conforme profundidade do local de coleta) para análise das concentrações de metais (total e dissolvido). As amostras, cada uma com 10 mL, serão obtidas por meio de uma garrafa horizontal de Niskin, imediatamente

acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO<sub>3</sub>, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas.

Além destas amostras, serão também obtidas três amostras de superfície e três de fundo, cada uma com 50 mL, de água filtrada em malha de 0,45 µm para análise das concentrações de metais dissolvidos e carbono orgânico dissolvido. Estas também serão acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO<sub>3</sub>, concentração final de 1%), além de mantidas refrigeradas e na ausência de luz. Em todas as amostras serão analisadas as concentrações de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg).

- Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água do rio Doce.

Os testes de ecotoxicidade demandam amostras adicionais às descritas para a análise química de água. Por isso, as amostras de água superficial e sedimento bruto deverão ser suficientes para todos os testes previstos neste Item 1.

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 elutriato), assegurando a investigação completa de efeitos tóxicos potenciais em vários níveis tróficos. Os testes previstos estão listados abaixo:

*Matrizes: água bruta e elutriato*

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

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

Nível trófico 2 - *Daphnia* spp. ou *Ceriodaphnia* spp.

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 Test” (FET) 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).

- Amostras da biota aquática

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

Serão obtidas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de quironomídeos, girinos de anfíbios, uma espécie de crustáceo (camarão de água doce - caso ocorra na porção mineira da bacia), duas espécies de peixes carnívoros (tucunaré e piranha), uma espécie de peixe onívoro (bagre *Pimelodus maculatus*) e uma espécie de peixe herbívoro (cascudo). Deverão ser coletadas também as seguintes espécies nativas que ocorrem em toda a bacia: *Hoplias malabaricus* (piscívoro, com uso amplo da coluna d’água), *Hypostomus* aff. *affinis*, *Geophagus brasiliensis* e *Astyanax* sp. (complexo *A. bimaculatus*) e ainda espécies de interesse comercial: *Prochilodus vimboides*, *Lophiosilurus alexandri*, *Salminus brasiliensis* e *Prochilodus costatus*.

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

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

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

Será coletada uma duplicata de todas as amostras destinadas à análise de concentração de metais para análises de biomarcadores. Os *pools* terão os mesmos 0,5 g cada e as espécies de peixes e camarão, as mesmas quantidades de exemplares. No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas/fígado serão acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou *ultrafreezer* (-80°C), para análise posterior de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em animais dulcícolas.

O monitoramento da comunidade microbiana total em amostras de água e sedimento na bacia do rio Doce será realizado utilizando-se triplicatas das amostras em cada ponto de coleta (total de até 12 amostras por ponto de coleta - Quadro 1), através da extração do DNA total dessas amostras e posterior análise molecular por métodos de *fingerprinting* e de sequenciamento de DNA, utilizando-se sequenciadores de DNA de nova geração. A análise das sequências obtidas deverá permitir a avaliação do *core* microbiano e os microrganismos presentes nas diferentes amostras, pontos e 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 deverá permitir não apenas indicar possíveis alterações ambientais temporais e/ou pontuais, como ainda apontar bioindicadores microbianos específicos da presença de sedimentos e/ou de impactos presentes nas diferentes áreas amostradas, que poderiam ser rastreados em áreas adjacentes.

- Análises de sedimento

Em cada ponto de coleta no Rio Doce (Quadro 1) serão coletadas amostras de sedimentos com auxílio de pá ou draga do tipo Van Veen, dependendo das características do local de coleta. Em cada local de amostragem serão coletadas quatro amostras de sedimento. As amostras deverão ser abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento, e 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), obtendo-se assim apenas o sedimento superficial. Para cada amostra, deverão ser coletados aproximadamente 10 g de sedimentos, os quais serão armazenados em pote plástico e mantidos congelados até o momento das análises. Em todas as amostras de sedimento deverão ser analisados os teores de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

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

Medidas da temperatura, pH e oxigênio dissolvido serão coletadas com uma sonda multiparâmetros. A concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) será determinada em amostras de água filtradas em malha de 0,45 µm, por meio de um analisador de carbono total (TOC). A concentração de sulfatos será determinada por método turbidimétrico com leitura em espectrofotômetro a 420 nm (TABATABAI, 1974). A alcalinidade total é mensurada por titulação com solução padrão ácida, utilizando-se método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (Ca, K, Mg e Na) é determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. A concentração de cloretos é analisada pelo método de formação de cianeto

férrico de enxofre. Com base nos resultados obtidos para as amostras de água doce, será realizada a modelagem ecotoxicológica dos dados com fins à previsão da biodisponibilidade e toxicidade de metais nos diferentes ambientes dulcícolas, por meio do Modelo do Ligante Biótico (BLM) versão 2.2.3.

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

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

As concentrações totais e dissolvidas dos metais nas amostras de água serão apresentadas em  $\mu\text{g/L}$  e comparadas com a Resolução CONAMA 357/2005, observando-se as classes de qualidade de cada amostra de água em análise. A acurácia e exatidão das análises serão aferidos por controles de qualidade analíticos: “brancos”, onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras são igualmente realizados, mas na ausência da amostra. Ademais, será utilizado solução padrão certificado do NRCC (SLRS 6: água doce). Serão apresentados percentuais de recuperação dos analitos presentes nas soluções-padrão certificadas, bem como seus limites de detecção e quantificação do método para As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, e Zn.

As amostras de material biológico são previamente secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante e depois digeridas em Suprapur® na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. Será obtido o teor de água de cada amostra. As amostras são submetidas à digestão ácida lenta em *ependorfs* devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até a digestão completa. Ao material biológico digerido será acrescentada água tipo Milli-Q até completar 1 mL. Caso necessário, as amostras serão diluídas

com água tipo Milli-Q para adequar as concentrações de arsênio e metais nas amostras às aquelas presentes nas soluções-padrão certificadas para calibração do equipamento.

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

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

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

- Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes

#### *Concentração de metalotioneínas*

A concentração de metalotioneínas será determinada segundo Viarengo *et al.* (1997). O material biológico é homogeneizado e centrifugado a 6.000  $\text{xg}$  por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o precipitado homogeneizado com 1 mL de etanol a 87% e clorofórmio a 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM). A solução resultante é centrifugada a 6.000  $\text{xg}$  por 10

minutos. O sobrenadante é novamente descartado e o novo precipitado homogeneizado em 150  $\mu\text{L}$  de NaCl (250 mM). Posteriormente são adicionados 150  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA (4 mM) e HCl (1 N). A seguir, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra (em duplicata) deverão ser adicionadas a 1,4 mL de solução de DTNB preparada em um tampão (pH 8,0) contendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (200 mM), NaCl (2 M) e DTNB (0,43 mM). Após nova centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos, 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra é transferido, em duplicata, para as poças de uma microplaca. A leitura de absorbância é feita em espectrofotômetro de microplacas a 405 nm. Os resultados serão apresentados em  $\mu\text{mol GSH/g}$  de peso úmido de tecido.

#### *Composição iônica corporal, hemolinfática ou plasmática*

Para determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados coletados são lavados em água tipo Milli-Q por 30 s, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa a 70°C, é determinado o peso seco do material e este digerido em Suprapur®. As amostras são diluídas para análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama, após digestão completa. A concentração de cloretos será determinada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre, sendo os resultados apresentados em mg/g de peso úmido.

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

#### *Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase*

Para a determinação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, as amostras biológicas serão preparadas conforme Péqueux & Chapelle (1982). As amostras são homogeneizadas em meio com 1 mL de tampão SI (sacarose - Imidazol em pH 7,6) e mantidas em banho de gelo. Depois serão centrifugadas a 5.000 rpm e a 5°C por 5 minutos. São recolhidos 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e adicionados 2,5 mL de uma solução salina A com 77 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 6 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 3 mM de ATP. O pH da solução é ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras são incubadas no escuro por 60 minutos a 25°C e feita a leitura a 620 nm. A mesma

reação é feita com 100  $\mu$ L de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina B com 83 mM de NaCl, 6 mM de  $MgCl_2$ , 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína.

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

#### *Atividade de enzimas envolvidas na calcificação*

A preparação das amostras para análise dos parâmetros de calcificação é feita por maceração em nitrogênio líquido e segregação em alíquotas de 150 a 200 mg. As amostras são homogeneizadas em tampão específico (1:1; peso/volume) para cada ensaio, com o auxílio de um sonicador e centrifugadas a 10.000 xg e 4°C por 20 minutos. O sobrenadante é imediatamente utilizado para as medidas de atividade enzimática ( $Ca^{2+}$ -ATPase,  $Mg^{2+}$ -ATPase e anidrase carbônica). A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas é realizada segundo o método de Bradford.

A determinação da atividade da anidrase carbônica é realizada pela mensuração da redução de pH associada à catálise da hidratação do  $CO_2$  com a consequente liberação de  $H^+$  (HENRY, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras é composto por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritiotreitól (DTT 1 mM). Quinze  $\mu$ L do homogeneizado são adicionados a 3 mL de uma solução de reação feita de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). São adicionados 280  $\mu$ L de substrato (água destilada saturada com  $CO_2$ ) e o pH registrado a cada 5 s durante 30 s por um pHmetro de bancada. Ao mesmo tempo são feitas determinações do “branco de reação”, quando 15  $\mu$ L do tampão de homogeneização são acrescentados à solução de reação e ao substrato. Será utilizado o modelo de regressão linear, sendo o pH a variável dependente e o tempo a variável independente, para definir a

declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos a partir dos homogeneizados é a taxa de reação catalisada, enquanto a média dos dados obtidos nos brancos é a taxa da reação não catalisada. Os resultados são normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e apresentados em unidades de anidrase carbônica/mg de proteína.

A determinação das atividades da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase seguirá Vajreswari *et al.* (1983) com adaptações. O homogeneizado da amostra é preparado com tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado é centrifugado a 10.000 xg a 4°C por 20 minutos, sendo 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante usados na análise. O meio de reação para análise da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é formado por NaCl (189 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM),  $\text{CaCl}_2$  (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação é feita a 30°C por 30 minutos.

No início da incubação, ATP (3 mM) e ouabaína (1mM) são adicionados aos meios de reação no início da incubação. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação é determinada pelo método colorimétrico (630 nm). Os resultados são normalizados com base na quantidade de proteínas totais presente nos homogeneizados e apresentados em mM Pi/mg proteína/min.

#### *Atividades de enzimas do metabolismo energético*

As atividades da lactato-desidrogenase (LDH) e malato-desidrogenase (MDH) serão determinadas em homogeneizados das amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados neste monitoramento. Estes homogeneizados são obtidos por maceração mecânica em mistura contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton x 100 e obtido o sobrenadante. Para LDH, a avaliação da atividade é feita pela mistura de solução de piruvato de sódio (1 mM), KCl (100 mM), tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e NADH (250  $\mu\text{M}$ ) a uma alíquota do sobrenadante de homogeneizado de brânquia e outra de fígado. Para MDH, são adicionados às alíquotas dos sobrenadantes uma solução de ácido oxalacético (0,4 mM),  $\text{MgCl}_2$  (20 mM), NADH (150  $\mu\text{M}$ ) e tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas seguem Thuensen *et al.* (2005) e Childress & Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, adaptadas por Ribeiro *et al.* (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas

enzimas em análise é determinada por espectrofotometria UV em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados devem seguir o método de Bradford. As atividades enzimáticas serão apresentadas em U/mg de proteína.

#### *Atividades de enzimas antioxidantes*

As atividades da catalase e da superóxido-dismutase são analisadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito para LDH e MDH. A atividade da catalase é determinada pela análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio, conforme Beutler (1975). A atividade da superóxido-dismutase é analisada pela mensuração do grau de redução do citocromo C, conforme McCord & Fridovich (1969). A dosagem de proteínas dos homogeneizados deve seguir o método de Bradford. A atividade da catalase será apresentada em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg proteína}/\text{min}$ , enquanto a atividade da superóxido-dismutase é apresentada em U/mg de proteína.

#### *Peroxidação lipídica (LPO)*

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

#### *Oxidação de proteínas*

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

#### *Dano de DNA*

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

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

O ensaio do vermelho neutro é feito com os hemócitos das amostras de hemolinfa de camarões das diferentes áreas do monitoramento. As lâminas para microscopia (76 x 26 mm) são lavadas antes da coleta (primeira lavagem com água e detergente neutro a 5%; segunda lavagem com água corrente; terceira lavagem com solução de água destilada saturada com HCl; quarta lavagem com água destilada em abundância). As lâminas são depois secas e uma de suas faces tratadas com solução de poly-L-lisina em água destilada (1:10) para a adesão dos hemócitos vivos na superfície. Isto é feito pingando-se 10  $\mu$ L dessa solução com uma micropipeta monocanal sobre uma das laterais da lâmina, fazendo esfregaço com lâmina e posterior disposição ao ar para secagem. A diluição da hemolinfa dos crustáceos é feita com solução fisiológica específica para a espécie-alvo. A solução estoque de vermelho neutro consiste da dissolução de 0,0228 g deste corante em 1 mL de DMSO (dimetil-sulfóxido), com posterior preparo da solução de trabalho de vermelho neutro (10  $\mu$ L da solução estoque + 5 mL de solução fisiológica) homogeneizada com agitador magnético por 1 a 2 minutos. Também deverá ser preparada uma solução anticoagulante, formada por 2,05 g glicose, 0,8 g de citrato de sódio e 0,42 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada, diluída com solução fisiológica na proporção 2:1 (0,334 mL de solução anticoagulante e 0,166 mL da solução fisiológica). Aspira-se 0,7 mL desta solução anticoagulante com uma seringa hipodérmica (1 mL) e agulha 21 gauge (que impede a destruição dos hemócitos e a formação de coágulos). À solução são adicionados 0,3 mL de hemolinfa do crustáceo, colhida na membrana de articulação carpo-propodal do quelípedo maior. O conteúdo é transferido para tubo siliconado (2 mL) e mantido em descanso por 15 minutos para minimizar a força de adesão, evitando o rompimento dos hemócitos e a coagulação. Quarenta  $\mu$ L dessa solução (hemolinfa, solução fisiológica e solução anticoagulante) são retirados com micropipeta e colocados ao centro da lâmina de microscopia previamente tratada, sendo então mantidas em câmara úmida escura por 15 minutos.

Quarenta  $\mu$ L da solução de trabalho de vermelho neutro são pipetados sobre cada lâmina, homogeneizado aos 40  $\mu$ L de hemolinfa previamente pipetados e cobertos por lamínula. As lâminas são mantidas em câmara úmida escura por mais 15 minutos para penetração do corante

nos hemócitos. Na primeira hora, as lâminas são examinadas em microscópio óptico a cada 15 minutos e a cada 30 minutos na segunda hora, se preciso. Deve ser utilizado o menor aumento, de 50x, com elevação gradual para 400 ou 500x, caso necessário. Quando da observação, a luz incidente deve ser reduzida porque o corante é foto-lábil. As células serão cuidadosamente examinadas e anotadas as anormalidades estruturais e o tempo de retenção do vermelho neutro. Para esta última observação, é estimada a proporção de células com perda lisossomal para o citosol e as anormalidades de tamanho e/ou cor dos lisossomos. Para a avaliação temporal das lâminas, o sinal “+” indica que <50% das células apresentam citosol claro e ausência de anormalidades estruturais ou estresse, o sinal “±” indica 50 a 75%, e o sinal “-” indica >75%.

A avaliação do dano no material genético também pode ser feita por ensaio de micronúcleo, sendo utilizadas amostras de hemolinfa e sangue. Após coleta das amostras com seringas (1 mL e agulhas 21 gauge), estas são transferidas para tubos siliconados. Os tubos são microcentrifugados a 1.000 rpm por 5 minutos e retirados 50 µL com micropipeta colocada junto ao fundo do tubo. Este material é gotejado na lateral da lâmina e espalhado por esfregaço com outra lâmina. O procedimento é realizado até a obtenção de três lâminas/indivíduo, sendo as lâminas secas ao ar, fixadas com solução de Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) por cerca de 20 minutos e novamente secas ao ar. As lâminas são então coradas com solução de Giemsa a 2%, preparada em tampão fosfato com pH 8,0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ), também por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas são lavadas com água deionizada, secas ao ar e com adesão de lamínulas com Entellan®.

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

O ensaio “cometa” é outra forma de avaliação de dano ao material genético, sendo utilizadas as mesmas amostras de hemolinfa e sangue. Alíquotas das amostras são misturadas a 100 µL (0,5%) de agarose com baixo ponto de fusão, diluídas em tampão fosfato (342 mM NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 1,7 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e 16 mM KCl (pH 7,6; 780 mOsmol/kg), e colocadas sobre

lâminas já preenchidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobertas por lamínulas e mantidas sob refrigeração por 5 a 7 minutos até se solidificarem. As lamínulas são então colocadas em solução de lise gelada com pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO e 1% TRITON X-100) por, no mínimo, 1 h, lavadas e mergulhadas em uma cuba com tampão alcalino de eletroforese com pH>13 (10 M NaOH, 200 mM EDTA) por 15 minutos para desnaturação do DNA. A eletroforese é feita sob 1V/cm e 300mA durante 15 minutos, em gelo. Depois, as lâminas são lavadas em tampão de neutralização com pH 7 (0,4 M Tris) por mais 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos.

São examinadas 100 células/lâmina, sendo duas lâminas/indivíduo. Os “cometas” são classificados em relação à extensão da migração do DNA (variável qualitativa), sendo: (0) sem dano; (1) ligeiramente danificado; (2) moderadamente danificado; (3) muito danificado; e (4) dano máximo. É também medida a “cauda” desses “cometas” (variável quantitativa), por meio do *software* KS-300®, em um sistema de análise de imagens por computador acoplado a um microscópio Axiolab®. A eletroforese deverá permitir avaliar os danos ao DNA causados por processos biológicos, como quebras de cadeia simples de DNA, lesões a sítios álcali-lábeis ou, ainda, reparo incompleto dos sítios de excisão. A variável qualitativa representa a proporção de extensão dos danos ao DNA nas quatro classes em análise, podendo ser confrontadas por uma análise de proporções multinomiais.

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

Padronizações quanto à recuperação antigênica, concentração de anticorpos e outros são realizados caso a caso.

#### *Danos morfológicos*

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

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

onde:

MC = massa corporal;

MP = massa total do órgão.

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

#### *Biomarcadores de desregulação endócrina*

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

## **4.2 Item 2 - Estudo e monitoramento do ambiente dulcícola da Área Ambiental I**

O Anexo 2 do TR4 informa que o primeiro ano de seu monitoramento se dará através do atendimento à Notificação IBAMA nº678311, série E, processo 02009.001478/2015-97. Este monitoramento foi realizado de abril de 2017 a abril de 2018 pela empresa Econservation, contratada pela FUNDAÇÃO RENOVA para condução das atividades. Um relatório semestral deste projeto foi entregue em 27 de agosto de 2018.

Sendo assim, este Plano de Trabalho dará continuidade aos aspectos tratados no “Programa de Monitoramento da Ictiofauna do Rio Doce nos Estados De Minas Gerais e Espírito Santo” seguindo as orientações dadas por este anexo para o segundo ano.

### **4.2.1 Objetivos**

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

### **4.2.2 Área de Estudo**

Para atendimento à Deliberação nº212 do CIF, restringe-se a atuação deste anexo aos 16 pontos de amostragem no rio Doce e seus afluentes localizados em Minas Gerais, conforme Quadro 1.

### **4.2.3 Metodologias e Periodicidade**

Este projeto irá amostrar trimestralmente a ictiofauna e macroinvertebrados bentônicos durante a execução do projeto. A flora aquática (fitoplâncton, perifiton, zooplâncton e macrófitas

aquáticas) e zooplâncton serão amostrados mensalmente. O ictioplâncton será amostrado mensalmente no período de seca e quinzenalmente no período chuvoso.

- Ictiofauna

Para a coleta de ictiofauna serão instaladas redes de emalhe, conforme Quadro 2, a partir das 16h00min e retiradas na manhã do dia seguinte, a partir das 08h00min. Serão amostrados trechos mínimos de 150 metros, com divisão em sessões de 50 metros e individualização das amostras coletadas. Os peixes coletados serão armazenados separadamente em sacos plásticos etiquetados de modo que cada amostra possa ser identificada separadamente. Inicialmente, os peixes coletados vivos serão expostos à solução de óleo de cravo para eutanásia e então, após óbito confirmado, serão dispostos em sacos plásticos individualizados por amostra, em solução de formaldeído para fixação inicial. Todas as amostras serão etiquetadas e catalogadas.

Todos os exemplares serão identificados em nível de espécie. Todos os locais de coleta, assim como todas as espécies coletadas, serão fotografados e georreferenciados, gerando banco de dados e de imagens fotográficas digitais. O registro fotográfico será realizado logo após a coleta, antes da fixação em formalina, a fim de garantir a fidelidade das características típicas de coloração para cada espécie, utilizando uma câmera digital, escala métrica e fundo padronizado para todos os locais de coleta. Uma ficha padrão será preenchida para fotográficos locais de coleta, conforme Anexo 2.2 do TR4.

**Quadro 2** - Petrechos a serem utilizados para captura de peixes.

<b>Petrechos</b>
Rede de pesca malha 2, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 4, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 6, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 8, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 10, fio 0,35 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 12, fio 0,35 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 14, fio 0,40 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 16, fio 0,40 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento

<b>Petrechos</b>
Tarrafa malha 2, fio 0,20 mm, 1,8 m de altura
Tarrafa malha 4, fio 0,40 mm, 2 m de altura
Tarrafa malha 6, fio 0,40 mm, 2 m de altura
Tarrafa malha 10, fio 0,50 mm, 4 m de altura
Tarrafa malha 12, fio 0,50 mm, 4 m de altura
Peneira 60x100 cm
Rede de arrasto malha 0,5 cm, linha de nylon multifilamento, 2 m de altura x 10 m de comprimento
Vara, linha e anzol e espinhéis

De todos os espécimes capturados, serão medidos o comprimento padrão (mm) e peso (g). Um percentual representativo de cada exemplar coletado será retirado para amostragem de tecido, que será conservada em etanol 96% para análises genéticas. Em seguida, os animais serão fixados em formalina a 10% e devidamente etiquetados, incluindo as coordenadas geográficas do local de coleta e data de captura. Após período de 24 a 48 horas, as amostras serão transferidas para solução de etanol a 70%. Dos espécimes capturados, um número representativo das espécies mais frequentes terá sua cavidade celomática aberta para estudos de conteúdo estomacal e gonadal (visualização de estômagos e gônadas).

#### *Composição e estrutura de comunidades*

A composição da ictiofauna será apresentada em tabelas (total e por local de coleta), indicando nome científico, nome popular, número de coleta e locais de amostragem para todas as espécies. As espécies serão classificadas como raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras, reoflicas, comerciais (consumo e ornamental), alóctones ou exóticas invasoras.

Será apresentada a curva do coletor e utilizados 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 a descrição da comunidade serão apresentados os seguintes índices:

- Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988);

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

Serão ainda realizadas análises multivariadas para verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies (MANLY, 1997; GAUCH JR., 1986) e a influência das características ambientais/fisiográficas/geográficas dos pontos sobre a distribuição das espécies (MANLY, 1997; TER BRAAK & SMILAUER, 2002).

#### *Estrutura e dinâmica de populações*

Deverão ser apresentadas informações prévias ao rompimento da barragem baseadas na literatura disponível para as espécies nativas (diagnóstico prévio), contendo estrutura das populações das espécies nativas mais abundantes e das espécies de importância para a pesca comercial, amadora e ornamental.

Para as espécies com ocorrência na área de estudo que constam das listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção que não for possível a coleta dos dados sobre a dinâmica da população, deverá ser realizado um levantamento bibliográfico detalhando a biologia da espécie em questão.

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

### *Ecologia trófica*

Serão analisados os conteúdos estomacais das espécies nativas mais abundantes e das espécies de importância para a pesca comercial, amadora e ornamental, utilizando-se métodos de ocorrência e volumétrico (HYNES, 1950; HYSLOP, 1980). Os percentuais obtidos com esses métodos deverão ser combinados no Índice Alimentar (IAI) de Kawakami & Vazzoler (1980).

Em caso de coleta de espécies ameaçadas de extinção, quando não for possível sua devolução ao ambiente, estas também deverão ser submetidas à análise descrita neste item.

### *Biologia Reprodutiva*

Serão determinados os estádios de desenvolvimento gonadal das espécies nativas mais abundantes e das espécies de importância para a pesca comercial, amadora e ornamental por meio da classificação de maturação gonadal determinada por Vazzoler (1996) e Brito & Bazzoli (2003). Poderá ser utilizada a classificação macroscópica das gônadas. Contudo, parte dos indivíduos deverá ser também avaliada microscopicamente a fim de validar, estatisticamente, a classificação macroscópica de cada estágio.

Será determinado o tamanho médio em que metade da população possua 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 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 deverão ser apresentados em gráficos.

Em caso de coleta de espécies ameaçadas de extinção, quando não for possível sua devolução ao ambiente, estas também deverão ser submetidas à análise descrita neste item.

### *Genética de populações*

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

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

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

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

#### *DNA Mitochondrial barcoding*

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

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

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

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

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

- Ictioplâncton

Os estudos sobre o ictioplâncton incluirão as seguintes análises:

- ✓ Identificação, a partir da distribuição espacial e temporal da abundância de ovos e larvas de peixes, dos ambientes mais relevantes para a desova;
- ✓ Identificação de áreas utilizadas pelas espécies de peixes em seu desenvolvimento inicial (criadouros naturais);
- ✓ Identificação de rotas utilizadas para migração e reprodução;
- ✓ Descrição de gradientes espaciais e temporais das diferentes fases de desenvolvimento dos peixes (ovos, larvas em pré-flexão, larvas em pós-flexão) e inferência sobre os deslocamentos.
- ✓ Importância dos afluentes para a recolonização da área afetada através da deriva de ovos e larvas de peixes.

As coletas serão mensais no período de seca e quinzenais no período chuvoso, sendo realizadas duas vezes ao dia (às 05:00 horas e às 21:00 horas) durante 4 dias consecutivos por local de coleta, com duração de 10 minutos em cada horário. Devem ser utilizadas redes de plâncton com formato cônico cilíndrico dotadas de um copo coletor e fluxômetro para calcular o volume filtrado. Para a coleta de juvenis, serão usados peneirões e rede de emalhar (1,5, 2,0, 2,5 e 3 cm de distância entre nós opostos) nas margens e outros locais propícios à coleta de formas jovens. Em ambientes lênticos, como reservatórios e remansos, a coleta será feita por arrastos superficiais e de meia-água. Em ambientes com características lóticicas, serão realizadas coletas de superfície e fundo, além de coletas nas margens. Em rios de menor porte, será utilizada amostragem ativa com peneiras e redes de ictioplâncton com cabo telescópico. Em córregos, serão usadas rede de ictioplâncton. Em locais que apresentem formações rochosas, pedras deverão ser lavadas para coleta de desovas adesivas.

O material coletado deverá ser acondicionado em frascos devidamente identificados (ponto amostral, hora, dia, mês) e fixados. Em cada ponto de amostragem, deverá ser preenchida a ficha de campo (Anexo 2.2 do TR4).

A triagem das amostras fixadas deverá ser feita sob microscópio estereoscópio, com as amostras colocadas em placas de acrílico do tipo Bogorov (ou de petri) para a separação dos ovos e larvas dos demais detritos. A identificação deverá ser realizada com o auxílio de chaves taxonômicas até o menor nível taxonômico possível. De forma complementar, ovos e larvas deverão ser identificados pela metodologia de *DNA barcoding* (BECKER *et al.*, 2015). A densidade de ovos e larvas na amostra deverá ser calculada de acordo com Tanaka (1973). Os padrões de distribuição de ovos e larvas e sua correspondência com as variáveis ambientais coletadas deverão ser analisados por meio de comparação descritiva (gráficos) e de técnicas de análise uni e multivariada.

- Fitoplâncton

A amostragem do fitoplâncton será realizada nos pontos da porção mineira do rio Doce apresentados no Quadro 1.

As coletas terão periodicidade quinzenal e deverão ser coletadas pelo menos três amostras de material vegetativo por ponto de coleta, retiradas aleatoriamente de ambas as margens e na calha central, onde se concentra a maior parte do material. Nestes pontos deverão ser determinados a temperatura e o pH da água utilizando sondas manuais, devidamente calibradas, pois estes parâmetros auxiliarão nas interpretações de testes bioquímicos em laboratório.

A coleta do fitoplâncton deverá ocorrer na subsuperfície (aproximadamente 30 cm de profundidade), utilizando-se rede de nylon com abertura de malha de 20 µm. A malha será corrida na coluna d'água e o material retido acondicionado em sacos plásticos transparentes.

O material coletado será transportado para laboratórios especializados para as análises específicas destinadas à elaboração do diagnóstico de qualidade da água e mensuração de impactos ambientais. Além das coletas de material para testes específicos serão também

coletadas amostras para identificação das espécies, seguindo-se a mesma metodologia descrita anteriormente.

Para análise quantitativa do fitoplâncton, ou seja, determinação da densidade, serão utilizadas amostras de 100 ml acondicionadas em frascos escuros e fixadas com solução de lugol-acético. A densidade será estimada pelo método de Utermohl, em microscópio invertido de 25 a 450 aumentos, usando-se tempo de sedimentação de, no mínimo, 3 horas para cada centímetro de altura da câmara (MARGALEF, 1983) para obtenção de 10 ml de volume sedimentado por amostra.

- Zooplâncton

As amostras de zooplâncton deverão ser coletadas com auxílio de uma motobomba, filtrando 1000 litros de água por amostra, em uma rede de plancton de 63 $\mu$ m de abertura de malha. A abundância deverá ser determinada a partir da contagem das amostras em câmaras de Sedgewick-Rafter, sob microscópio ótico. As amostras deverão ser concentradas em um volume de 100 ml e as contagens realizadas a partir de 5 subamostras (de 10 ml) tomadas com pipeta do tipo Stempel, sendo a densidade final expressa em indivíduos.m<sup>-3</sup>. Após as contagens das 5 subamostras deverá ser realizada uma análise qualitativa da amostra. Em cada amostra, subamostras deverão ser analisadas até que nenhuma espécie seja acrescentada.

- Perifíton

Para as coletas de perifíton, devem ser selecionados quatro trechos de rios em Minas Gerais, sendo um para servir de referência, um afetado por rejeitos de mineração, um afetado por despejo de efluentes e um afetado por efluentes e rejeitos de mineração. Estes trechos devem ser amostrados quatro vezes em um ano, sendo duas vezes na estação chuvosa e duas vezes na estação seca.

Em cada um desses ambientes será escolhido um tipo de substrato, entre seixo, cascalho, rocha exposta ou areia, comum aos quatro ambientes, dos quais serão coletadas três amostras qualitativas do perifíton. Estas áreas serão delimitadas com o auxílio de uma lâmina de acetato,

da qual será removido um quadrado de 10 cm de lado, de forma que a lâmina de acetato funcione como uma moldura da superfície de amostragem. As amostras obtidas para análises qualitativas serão fixadas com solução Transeau (6:3:1 água destilada, álcool etílico 70%, formol) e as obtidas para análises quantitativas devem ser fixadas em solução de Lugol acético a 5%.

Para estimativa da biomassa fotossintética, deverão ser avaliados os teores de clorofila “a” e o material raspado nos diversos substratos deverão ser filtrados, conforme Golterman *et al.* (1978).

- Macrófitas aquáticas

Serão realizadas coletas de macrófitas aquáticas, em ambas as margens e na calha central do rio Doce. As amostragens terão periodicidade quinzenal, sendo coletadas pelo menos três amostras de material vegetativo por ponto de amostragem. Serão determinadas a temperatura e o pH da água no momento das coletas para auxiliar nas interpretações de testes bioquímicos em laboratório.

O procedimento de coleta será o método do quadro, ou metodologia de Westlake, que consiste na utilização de um quadro de madeira (0,5 m<sup>2</sup>) para delimitar as parcelas onde o material deverá ser coletado. Os quadros serão lançados em pontos aleatórios dentro da malha amostral. Lançados os quadros, serão coletadas pelo menos três partes de material vegetativo, que serão transferidos para sacos plásticos de material transparente e estéreis. Todo o material coletado será conduzido a laboratórios especializados para as análises específicas. Além das coletas de material para testes específicos, serão coletadas amostras para identificação botânica das espécies. As coletas para identificação botânica seguirão a mesma metodologia das coletas para análise; contudo, o material será armazenado em sacos de papel. Todo material coletado para identificação botânica deverá conter flor e/ou fruto. Depois de coletado, o material para identificação deverá ser prensado para confecção de exsiccatas e conduzido a um herbário registrado, onde será identificado e armazenado em condições adequadas.

- Macroinvertebrados bentônicos

Como estas comunidades apresentam natureza agregada, será feita a tomada de réplicas para aumentar a eficiência das amostragens realizadas. Será aplicado um número mínimo de três réplicas por ponto amostrado. Serão descartadas amostragens onde houver perda de material, seja por transbordo ou vazamentos de sedimento ao chegar à superfície, já que a perda de material é evidente. Considerando que a maior parte dos organismos se concentra nos 10 cm superiores de sedimento, para amostragem adequada a draga estará preenchida com cerca de 2/3 a 3/4 de material. No intuito de prevenir a continuidade de processos interativos entre os organismos, como a predação, e a decomposição da amostra, que interferem resultado final, após a coleta, as amostras serão fixadas, ainda em campo, com formalina neutralizada (com bórax ou bicarbonato de sódio) em volume tal que a concentração final na amostra atinja de 4 e 10%, ou seja, cerca de 100 ml para cada litro de amostra.

Para análise, as amostras de sedimento serão lavadas com água corrente em rede com malha 0,25mm (recomendada para levantamento faunístico), reduzindo o volume da amostra ao eliminar partículas orgânicas e inorgânicas finas, o que facilita a visualização dos organismos. Após a lavagem, as amostras serão armazenadas no formol 4-10% ou álcool 70, em volume tal que a proporção entre a amostra e o preservante não ultrapasse 1:2 (1/3), principalmente quando houver muito material orgânico.

Será realizado o levantamento quali-quantitativo com a identificação taxonômica com auxílio de guias especializados, até o nível de espécie quando possível. Para tal, a triagem será realizada sob lupa (microscópio estereoscópico) o que possibilitará a identificação através da visualização de caracteres morfológicos externos dos indivíduos amostrados.

- Integridade ambiental

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

Uma dessas fichas será baseada no Índice de Integridade do Hábitat (IIH; Nessimian *et al.*, 2008), constituído por 12 itens que descrevem as condições ambientais e avaliam características

como o padrão de uso da terra adjacente à vegetação ribeirinha, largura da mata ciliar e seu estado de preservação, estado da mata ciliar dentro de uma faixa de 10 m, descrição da condição do canal quanto ao tipo de sedimento e presença de dispositivos de retenção, estrutura e desgaste dos barrancos marginais do rio, caracterização do leito do rio quanto ao substrato, vegetação aquática, detritos e disposição das áreas de corredeiras, poções e meandros. Cada item é composto de quatro a seis alternativas, ordenadas de forma a representar sistemas cada vez mais íntegros. Os valores obtidos variam em uma escala de 0 (baixa integridade) a 1 (alta integridade).

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

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

### **4.3 Item 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce (Área Ambiental 1)**

O Anexo 3 visa implementar um programa de monitoramento na área de estudo com coleta e análise de parâmetros sedimentológicos e geoquímicos (granulometria, mineralogia, metais, isótopos, nutrientes e orgânicos) em associação com parâmetros biológicos (composição, estrutura e dinâmica das comunidades planctônicas a partir de coletas periódicas). A metodologia de coleta e análise de parâmetros biológicos foi apresentada no âmbito do item anterior (Item 2).

### **4.3.1 Objetivo**

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

### **4.3.2 Área de Estudo**

Para atendimento à Deliberação nº 212 do CIF, restringe-se a atuação deste anexo aos 16 pontos de amostragem rio Doce e seus afluentes localizados em Minas Gerais, conforme Quadro 1.

### **4.3.3 Metodologias e Periodicidade**

Na malha de amostragem do território mineiro, composta de 16 pontos, serão medidos mensalmente os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), biomassa de plâncton (fito e zooplâncton), perifíton e sedimento de fundo (química e sedimentologia).

- Procedimentos para coleta de água e sedimento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Para cada amostra deve-se registrar:

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

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

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

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

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

Deverão ser coletadas subamostras do sedimento seguindo a seguinte metodologia:

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

Dessa forma, em cada ponto de amostragem será realizada a aferição de todos os parâmetros. Todos os procedimentos analíticos, desde a escolha e limpeza dos recipientes até o processamento, preservação e conservação das amostras, para cada tipo de análise seguirão as determinações do Anexo 3 do TR4.

**Quadro 3** - Parâmetros das amostragens de água e sedimento.

<b>Matriz</b>	<b>Parâmetro geral</b>	<b>Parâmetros específicos</b>
Água	Metais	Totais, Dissolvidos, Particulados, Especiação e Mercúrio.

Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis. Matéria orgânica dissolvida
	Elementar (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Enxofre.
	Isótopos (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Compostos orgânicos específicos.
	Nutrientes	Fósforo total, Fósforo dissolvido, Orto-fosfato, Nitrito, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Silício e N/P Total.
	Parâmetros Físico-químicos	pH, ORP, Salinidade, Temperatura, Alcalinidade, sólidos totais dissolvidos, DBO e DQO, Condutividade elétrica, turbidez, sólidos em suspensão, sólidos totais, sólidos sedimentáveis.
	Biológicos/ Balneabilidade	Coliformes Totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> .
	Metais*	Sequencial (frações + total), Terras Raras e Mercúrio. *Alumínio; Arsênio; Bário; Boro; Cádmio; Cálcio; Chumbo; Cobre; Cromo; Ferro; Fluoreto; Fósforo; Lítio; Magnésio; Manganês; Mercúrio; Níquel; Selênio; Vanádio; Zinco; Berílio; Cobalto; Fluoreto; Lítio; Vanádio
Sedimento	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis.
	Elementar	Carbono, Nitrogênio, Arsênio e Enxofre.
	Isótopos	Carbono, Nitrogênio, <sup>210</sup> Pb/ <sup>137</sup> Cs e Compostos orgânicos específicos.

Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
	Nutrientes	Especiação de Ortofosfato em Água Intersticial, fósforo total.
	Parâmetros Físico-químicos	ORP, pH.

Fonte: Anexo 3, TR4.

- Análise de metais em água

#### *Metais totais*

Para a extração dos metais totais nas amostras de água deverá ser utilizado o método EPA 3015A, que consiste em adição de 4 mL de HNO<sub>3</sub> destilado (*sub-boiling*) + 2 mL de HCl em uma alíquota de 45 mL da amostra e posterior aquecimento em forno microondas. A quantificação dos elementos sob análise será realizada pelo método EPA 6020A e EPA 6010C, que adotam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. O mercúrio (Hg) deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP-MS.

#### *Metais dissolvidos*

A amostra deverá ser filtrada em membrana de porosidade 0,45 µm. Será recolhida uma alíquota, que será acidificada (pH < 2) com adição de HNO<sub>3</sub> destilado (*sub-boiling*) e armazenada até análise. A amostra acidificada deverá ser neutralizada e passada em colunas com resina catiônica (Chelex®) para eliminação de sódio (Na), etapa necessária devido à quantificação ser realizada em ICP-MS. A quantificação dos elementos sob análise deverá ser realizada pelo método EPA 6020A e EPA 6010C, que empregam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. O Hg deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP-MS.

#### *Especiação de metais*

A especiação de metais será realizada pela técnica de difusão por filmes finos em gradientes de concentração (DGT - *Diffusive Gradients in Thin Films*), caracterizada por um sistema sequencial com um gel ligante, um gel difusivo e um filtro de acetato de celulose (porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Após o período de imersão, os dispositivos devem ser lavados com água ultrapura e colocados em sacos plásticos umedecidos para transporte ao laboratório, onde será feita a abertura dos dispositivos DGT, descarte dos filtros e géis difusivos e inserção dos géis ligantes em tubos Falcon para iniciar o procedimento de eluição dos metais. O processo é realizado com a adição de  $\text{HNO}_3$  destilado (*sub-boiling*) nos tubos e sua agitação orbital por 24 horas. Após a agitação, as resinas são recolhidas e adicionada água ultrapura à solução eluída, sendo as amostras quantificadas pela técnica de ICP-OES.

#### *Metais no material particulado em suspensão*

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

#### *Metais parciais*

Na membrana saturada pelo MPS serão adicionados 10 mL de  $\text{HNO}_3$  destilado (*sub-boiling*) e aquecida em forno microondas (EPA 3051A). Após a digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos realizada por meio do ICP - MS (Método EPA 6020A).

#### *Terras Raras*

A decomposição das amostras de MPS para análise de terras raras será feita pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*),  $\text{HNO}_3$  destilado (*sub-boiling*) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck). Na membrana saturada pelo MPS serão adicionados 10 mL desta mistura de reagentes e aquecida em forno microondas. Após o término da digestão ácida, as

amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos será realizada por ICP - MS (Método EPA 6020A).

- Análise de metais em sedimentos

#### *Metais totais*

A decomposição das amostras de sedimentos para análise de metais totais será feita pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*), HNO<sub>3</sub> destilado (*sub-boiling*) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). Em 0,25 g de sedimento previamente liofilizado e macerado deverão ser adicionados 10 mL desta mistura de reagentes e aquecidas em forno microondas. Após a digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos será realizada em ICP - MS (Método EPA 6020A). O Hg será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

#### *Metais parciais*

Para análise de metais parciais será utilizado o método EPA 3051A (extração parcial). Uma alíquota de 0,25 g de sedimento será liofilizada e macerada (gral e pistilo de ágata), sendo adicionados 10 mL de HNO<sub>3</sub> destilado (*sub-boiling*) e aquecida em forno microondas. Após a digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos realizada em ICP - MS (Método EPA 6020A).

#### *Extração sequencial de metais*

Análise de metais nas diferentes frações dos sedimentos será feita por extração sequencial, conforme Tessier *et al.* (1979). Isto inclui a quantificação de metais em cinco frações distintas, obtidas pela eluição sequencial de uma mesma amostra sedimentar (Quadro 4). Os metais nos diferentes extratos serão quantificados em ICP-MS (EPA 6020A). O Hg será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

**Quadro 4 - Método de extração sequencial proposto por Tessier *et al.* (1979).**

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

Fonte: Anexo 3, TR4.

### *Terras Raras*

A decomposição das amostras de sedimentos para análise de terras raras será feita pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*), HNO<sub>3</sub> destilado (*sub-boiling*) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). Na membrana saturada pelo MPS serão adicionados 10 mL desta mistura de reagentes e aquecida em forno microondas. Após o término da digestão ácida, as amostras passarão por filtro qualitativo e a quantificação dos elementos será realizada por ICP-MS (Método EPA 6020A).

- Mobilidade de contaminantes e modelo de atenuação

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

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

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

As amostras de sedimento passarão por procedimento para extração da água intersticial, que será analisada por ICP-MS para os mesmos metais analisados no sedimento. O método de extração utilizado com mais frequência é a centrifugação.

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

Nas amostras com potencial redox negativo, particularmente aquelas em áreas mais protegidas do estuário e nos manguezais da região, será aplicado o método AVS/SEM. Este método consiste no ataque de uma amostra em sistema fechado com ácido clorídrico 6N. O procedimento volatiliza parte do enxofre (ácido-volátil) que é depois capturado em uma coluna *trap* de gás de permanganato de potássio. A solução de ácido clorídrico contém os metais simultaneamente extraídos e que poderão ser medidos por absorção atômica, ICP-OES ou ICP-MS. Os sulfetos são medidos na solução de permanganato como sulfatos.

- Matéria orgânica dissolvida

### *Mensuração de carbono orgânico dissolvido (COD)*

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

### *Caracterização da matéria orgânica dissolvida colorida (MODC)*

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

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

onde:

$a_\lambda$  = absorbância espectrofotométrica;

r = caminho ótico da cubeta (m).

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

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

intervalos 275 nm a 295 nm (S275-295nm) e 350 a 400 nm (S350-400nm). O índice de fluorescência (FI) será calculado como a razão das intensidades de fluorescência a 470 nm e 520 nm de emissão e 370 nm de excitação.

- Outros orgânicos

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

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

As amostras de sedimento serão armazenadas em *freezer* até os procedimentos laboratoriais para a determinação de hidrocarbonetos. Alíquotas de cada amostra serão liofilizadas e posteriormente homogeneizadas por maceração com auxílio de gral e pistilo. As metodologias a serem utilizadas para a extração e determinação de hidrocarbonetos de petróleo, HPA e biomarcadores serão baseadas nos protocolos EPA 3540c - *Soxhlet Extraction* (USEPA, 1996), EPA 8270d - *Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography / Mass Spectrometry* (GC/MS) (USEPA, 2007).

Aproximadamente 10 g de sedimento liofilizado e 2 g de cobre ativado para a remoção de enxofre molecular serão adicionados em cartuchos de celulose e extraídos em Soxhlet (12 h /

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

A quantificação e identificação dos compostos será realizada em cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c, ambos equipados com auto amostradores CTC CombiPal, injetor *split/splitless* e coluna capilar DB-5MS (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP será preparada a partir de um *mix* padrão de alcanos (n-C8 - C40) na faixa de concentração de 0,5 a 50,0 µg/mL com padronização interna (n-C16d - 10 µg / mL). A determinação quantitativa de HTP será feita pela integração da área total dos cromatogramas, englobando toda a fração resolvida e não-resolvida através da determinação da linha de base, descontando-se as áreas dos picos dos padrões. A programação de temperatura deverá ser configurada com a temperatura inicial de 60 °C por 1 min, então 6 °C / min até 300 °C por 30 min. Para as determinações utilizando-se GC-MS, as condições deverão ser as mesmas, com o acréscimo dos parâmetros de temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e quadrupolo:

300°C; 300°C, 200°C e 150°C, respectivamente. A quantificação dos HPA também será realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas serão construídas na faixa de concentração de 5 a 1000 ng/mL utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12) na concentração de 100 ng/mL. Os íons utilizados para a quantificação de HPA prioritários, assim como dos seus respectivos padrões internos, são apresentados no Quadro 5. Os HPA serão determinados por meio de monitoramento *fullscan* (m/z 50-550) e monitoramento de íons selecionados (SIM), seguindo os seguintes atributos: temperatura inicial de 40 °C por 2 min, com taxas de aquecimento de 25 °C / min até 100 °C, 5° C / min até 230 °C, 2 °C / min até 270 °C mantidos por 5 min e 5 °C / min até a temperatura final de 300 °C. Para a determinação dos biomarcadores lipídicos serão utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. Os demais compostos identificados deverão ser determinados em função do padrão interno adicionado, devido à inexistência de padrões comerciais referentes às classes a serem avaliadas.

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

**Quadro 5** - Íons de quantificação dos 16 HPA e padrões internos.

<b>Padrão</b>	<b>Íons de Quantificação (m/z)</b>	<b>Padrão Interno</b>	<b>Íons de Quantificação (m/z)</b>
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

<b>Padrão</b>	<b>Íons de Quantificação (m/z)</b>	<b>Padrão Interno</b>	<b>Íons de Quantificação (m/z)</b>
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

Fonte: Anexo 3, TR4.

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

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

#### *Pesticidas clorados e bifenilaspolicloradas (PCBs)*

Os sedimentos serão processados conforme método analítico descrito em UNEP (1992). Aproximadamente 100 g de sedimento deverão ser secos em um liofilizador, desagregados utilizando almofariz e pistilo de porcelana, homogeneizados e armazenados em frascos de vidro. Durante as análises, deverão ser adicionados 100 µL de uma mistura de padrões subrogados a aproximadamente 20 g de sedimento seco para a determinação de compostos organoclorados [PCB 103 (C-103N) e PCB 198 (C-198N), AccuStandard, USA].

Posteriormente, serão extraídos em aparato Soxhlet durante 8 h com 80 mL de n-hexano e diclorometano (1:1) (J. Baker, México). Os extratos serão concentrados a 2 mL e submetidos à purificação por cromatografia de adsorção em coluna de alumina, com eluição de 15 mL de uma mistura a 30% de diclorometano em n-hexano para a obtenção da fração contendo os compostos organoclorados. Os extratos resultantes deverão ser então concentrados a aproximadamente 500 µL.

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

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

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

*Éter-aminas e aminas aromáticas*

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

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

- Elementar

#### *Carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e enxofre*

A caracterização da matéria orgânica será feita por meio de análises sobre composição de seus elementos majoritários, predominância isotópica entre eles e moléculas que formam. As análises da composição elementar (C, N, P, S) nos sedimentos deste estudo serão realizadas após a descarbonatação, por meio da adição de HCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup> diretamente nas amostras dentro dos frascos de análises. Este procedimento será repetido por duas vezes, sendo as amostras secas em estufa a 60°C por 12 h.

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

- Isótopos

*Isótopos estáveis (carbono e nitrogênio),  $^{210}\text{Pb}/^{137}\text{Cs}$ , compostos orgânicos específicos*

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

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

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

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

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

onde:

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

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

F = fator de auto-absorção;

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

t = tempo de contagem da amostra, em segundos;

m = massa da amostra, em quilogramas;

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

$\varepsilon$  = eficiência do detector.

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

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

onde:

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

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

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

t = tempo de contagem da amostra, em segundos;

m = massa da amostra, em quilogramas;

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

$\varepsilon$  = eficiência do detector.

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

- Nutrientes dissolvidos (somente em água)

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

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

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

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

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

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

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

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

*Nitrogênio e fósforo totais*

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

### *Especiação de fósforo (P)*

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

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

As etapas de extração são apresentadas no Quadro 6. Cada extrato será analisado por colorimetria segundo Murphy & Riley (1962).

**Quadro 6** - Etapas de extração de fósforo (P).

<b>Fração extraída</b>	<b>Extrator (tempo)</b>	<b>Reação química</b>
P-trocável	NaHCO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O + tolueno 3x24h	Desorção sem atividade bacteriana em água artificial
P-ligado a ferro (III) amorfo	Ascorbato (20 g/L) 24h	Redução de óxidos de ferro (III) amorfo e dissociação do P
P-ligado a ferro (III) cristalino	ditionitocitrato bicarbonato 4h	Dissociação de óxido de Fe (III) reduzível e P associado
P-ligado a Hidroxiapatita autigênica	NH <sub>4</sub> 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

Fração extraída	Extrator (tempo)	Reação química
P-ligado a apatita detrital e carbonato	HCl (1M) 16h	Dissociação ácida de carbonatos e apatita
P-orgânico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (18M) 16h	Dissociação ácida da matéria orgânica

Fonte: Anexo 3, TR4.

- Clorofila-a e Feopigmentos

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

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

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

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

- Material Particulado em Suspensão (MPS)

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

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

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

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

- Sedimento - Granulometria e Composição

O sedimento será lavado em água doce para retirada de sal e colocado para secar em estufa a 40°C pelo tempo que for necessário para completa retirada de água. Após a secagem, o sedimento será pesado e peneirado via úmida em peneira de 63  $\mu\text{m}$  para separação da fração areia. O procedimento de secagem da fração areia será repetido e feita nova pesagem desta fração para determinação dos teores de lama e areia. A granulometria da fração areia será determinada por peneiramento de 0,5 em 0,5  $\Phi$  e a fração lama levada ao granulômetro a laser após queima de MO por peróxido. No caso da fração lama, não há necessidade de novo procedimento de secagem, pois o granulômetro usa amostras úmidas. Os valores dos teores serão determinados a partir da diferença entre o peso total e o peso da fração areia, resultando no peso da fração lama.

### *Densidade*

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

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

### *Análise de clorofila*

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

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

equipamento e realizadas as leituras nos comprimentos de onda de 665 nm, 647 nm, 630 nm e 750 nm, anotando em uma planilha as absorbâncias de cada comprimento de onda. É necessário “zerar” a leitura com acetona 90% a cada mudança de comprimento de onda.

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

## 5. CRONOGRAMA E EQUIPE EXECUTORA

A FUNDAÇÃO RENOVA está em negociação com a Fundação Espírito-Santense de Tecnologia (FEST), fundação de apoio universitário da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), entidade jurídica com a qual foi firmado Acordo de Cooperação para a contratação do grupo de pesquisadores intitulado “Rede Rio Doce Mar” (RRDM), que são responsáveis pela condução dos estudos em atendimento a Cláusula 165 na porção continental capixaba e marinha. A RRDM está elaborando a proposta técnica deste aditivo, onde serão indicados a equipe responsável e o cronograma de ações para atendimento destas atividades. Sendo assim, este Plano de Trabalho receberá o complemento destas informações posteriormente.

A relação dos profissionais que poderão coordenar os estudos relacionados neste Plano de Trabalho, assim como as instituições a que estão afiliados e Anexos pelos quais serão responsáveis, é apresentada no Quadro 7. Esta indicação foi baseada nos coordenadores em atuação nos estudos realizados na porção capixaba do rio Doce e poderá ser alterada após definição da proposta técnica da RRDM.

**Quadro 7** - Possível Equipe Executora Principal (Coordenadores Gerais e de Projetos).

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
1	Adalto Bianchini	Doutor II - Coordenador Geral	Ecotoxicologia e análises de contaminantes orgânicos e biomarcadores em amostras biológicas e metais em amostras ambientais (água, sedimento e biota)	FURG	1
2	Alessandra Delazari Barroso	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de fitoplâncton dulcícola	FAESA	3
3	Ana Cristina Teixeira Bonecker	Doutor II – Coordenador Projeto	Ictioplâncton	UFRJ	3

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
4	Anderson Geyson Alves de Araújo	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de macrófitas aquáticas	UFES	3
5	Aureo Banhos	Doutor II - Coordenador de Projeto	Genética Populacional e Gestão de Dados	UFES	2
6	Björn Gücker	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ciclagem de matéria e fluxo de energia	UFSJ	3
7	Camilo Dias Junior	Doutor II - Coordenador Projeto	Fitoplâncton	UFES	3
8	Edmilson Costa Teixeira	Doutor II – Coordenação Geral	Integração e Atuação em Rede	UFES	Todos
9	Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Ecologia e taxonomia de zooplâncton dulcícola	UFOP	3
10	Eustáquio Vinícios Ribeiro de Castro	Doutor II – Coordenação Geral	Gestão de Projetos	UFES	Todos
11	Gilberto Barroso	Doutor II – Coordenação Geral Anexo	Análise de aporte de nutrientes e poluentes	UFES	3
12	Iola Gonçalves Boechat	Doutor II - Coordenador de Sub-Projeto	Mixotrofia e ecofisiologia de organismos	UFSJ	3
13	Jorge Dergam	Doutor II - Coordenador	Projeto Genética de Peixes	UFV	2

Nº	Nome	Titulação	Área de Especialização/Atuação	ICT	Atuação no Anexo
14	Leila Longo	Doutor II – Coordenador Temático Bentos	Bentos	UFRB	3
15	Luiz Fernando Loureiro Fernandes	Doutor II – Coordenador	Projeto Zooplâncton	UFES	3
16	Renato Ghisolfi	Doutor II – Coordenador Projeto	Modelagem	UFES	3
17	Renato Rodrigues Neto	Doutor II – Coordenador Projeto	Análises Hidrogeoquímicas	UFES	3
18	Valéria da Silva Quaresma	Doutor II – Coordenador Projeto	Sedimentologia	UFES	3
19	Valéria de Oliveira Fernandes	Doutor II - Coordenador de Sub- Projeto	Ecologia e taxonomia do perifíton	UFES	3

## 6. 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.

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2014. Portaria N° 444, de 17 de Dezembro de 2014: Reconhece como espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção” - Lista, conforme Anexo I da presente Portaria, em observância aos arts. 6º e 7º, da Portaria n° 43, de 31 de janeiro de 2014. **Diário Oficial da União**, 245: 121-144.

MÜLLER, G. (1969). Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. **Geological Journal**, 2, 109-118.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NESSIMIAN, J.L.; VENTICINQUE, E.M.; ZUANON, J.; DE MARCO JR., P.; GORDO, M.; FIDELIS, L.; BATISTA, J.D.; JUEN, L. 2008. Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. **Hydrobiologia**, 614: 117-131.

OAKES, K.D. & VAN DER KRAAK, G.J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, 63: 447-463.

PÉQUEUX, A. & CHAPELLE, S. 1982. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and phospholipids in two euryhaline crabs related to changes in the environmental salinity. **Marine Biology Letters**, 3: 43-52.

RIBEIRO, A.C.; BATISTA, M.T.O.; RODRIGUES JR., E.; OLIVEIRA, M.F.; VANI, G.S.; RODRIGUES, E.; SUDA, C.N.K. 2015. Atividades de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadoras de impacto ambiental. **Revista Ambiente & Água**, 10: 793-803.

TABATABAI, M.A. 1974. A rapid method for determination of sulfate in water samples. **Environmental Letters**, 7: 237-243.

VAJRESWARI, A.; SRINIVASA RAO, P. KAPLAY, S.S.; TULPUL, P.G. 1983. Erythrocyte membrane in rats fed high eurycic acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)- and (Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-ATPases. **Biochemica Medica**, 29: 74-84.

VALDERRAMA, J. C. The Simultaneous Analysis of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Natural Waters. **Marine Chemistry**, v. 10, p. 109-122, 1981.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, 44: 69-84.

WRIGHT, LD, SHORT, AD 1984 Morphodynamic variability of surf zones and beaches: A synthesis. **Marine Geology**, 56:93-118.