

SEQ2800-03/2017/GJU

Nº IBAMA: 02001.001577/2016-20 (CIF)

Nº IBAMA: 02001.004152/2016-72 (CTBio)

Belo Horizonte, 06 de julho de 2017.

Ao

COMITÊ INTERFEDERATIVO – CIF

A/C: SRA. SUELY MARA VAZ GUIMARÃES DE ARAÚJO

PRESIDENTE DO COMITÊ INTERFEDERATIVO E DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA

SCEN Trecho 2, Edifício Sede do Ibama, Caixa Postal nº 09566, Brasília/DF

CEP: 70818-900

C/C:

À

CÂMARA TÉCNICA DE CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE – CTBIO

A/C: SR. MARCELO MARCELINO DE OLIVEIRA

COORDENADOR DA CÂMARA TÉCNICA DE CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE E DIRETOR DE
PESQUISA, AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE DO ICMBIO

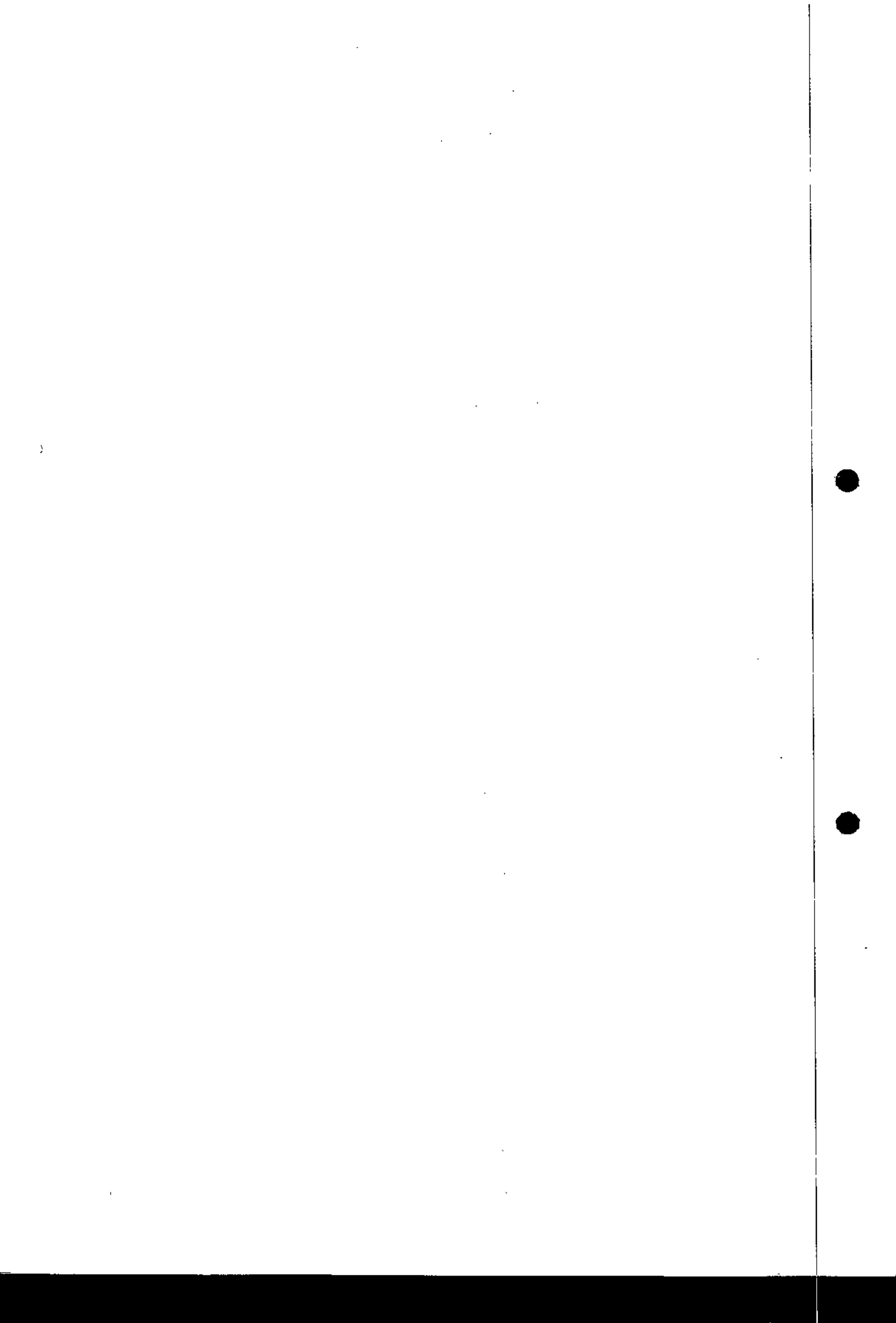
ESQW 103/104, Bloco "C", Complexo Administrativo, Setor Sudoeste, Brasília/DF

CEP: 70670-350

**REF.: Atendimento ao item 1 da Deliberação CIF nº 79, de 27 de junho de 2017,
para cumprimento parcial da Cláusula 165 do TTAC.**

Prezados Senhores,

A **FUNDAÇÃO RENOVA** ("FUNDAÇÃO"), pessoa jurídica de direito privado, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 25.135.507/0001-83, com sede na Avenida Getúlio Vargas, nº 671, 4º andar, Belo Horizonte/MG, CEP 30.112-021, vem, respeitosamente, por seu representante legal abaixo assinado, em atenção à Deliberação CIF nº 79, de 27 de junho de 2017, expor o quanto segue.

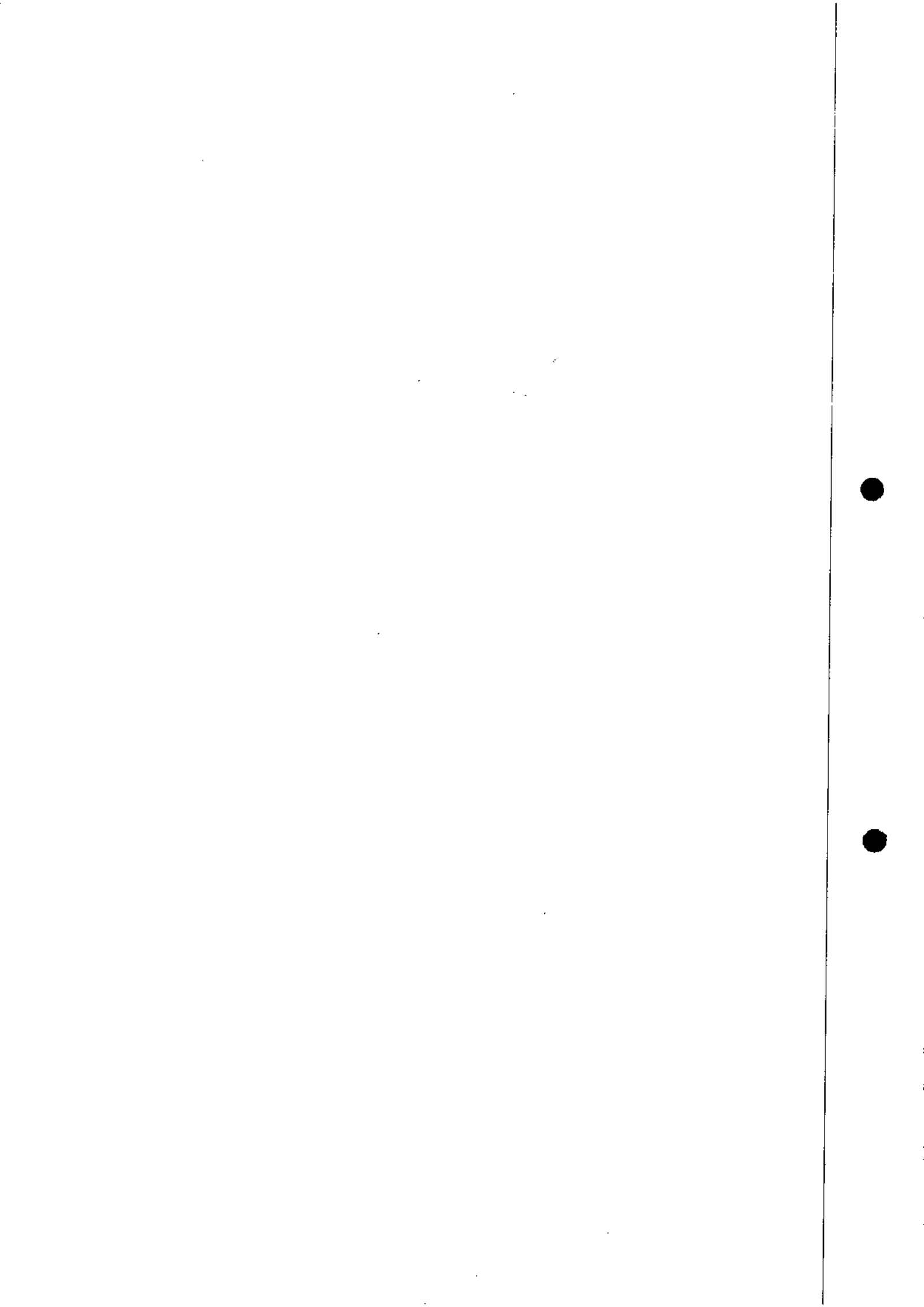


Como se sabe, o Programa de conservação da biodiversidade aquática, incluindo água doce, zona costeira e estuarina e área marinha impactada, (PG028), está previsto no âmbito das Cláusulas 164 a 166 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta, firmado em 2 de março de 2016 (TTAC).

De acordo com o item II da referida Cláusula 165¹, a FUNDAÇÃO deverá apresentar os resultados dos estudos para caracterização do impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho e para a avaliação do *habitat* de fundo marinho, incluindo algas calcáreas, rodólitos e corais nas áreas estuarinas, marinha e da foz do rio atingidas pelo material oriundo do rompimento da barragem de Fundão, em Mariana/MG.

Para a elaboração dos estudos referentes à Cláusula 165, mais especificamente para as alíneas "a" do item I e "a" e "b" do item II, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) apresentou, em 20 de outubro de 2016, o Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4), no qual constam, de forma bastante detalhada, todos os estudos a serem desenvolvidos, as metodologias a serem empregadas e os perfis dos profissionais responsáveis pela condução dos trabalhos.

¹ CLÁUSULA 165: A FUNDAÇÃO deverá elaborar e implementar medidas de monitoramento da fauna da foz do Rio Doce e ambientes estuarinos e marinhos impactados, devendo: I. Apresentar, até o último dia útil de junho de 2016: a) Proposta de estudo para avaliação da qualidade da água e ecotoxicidade sobre os organismos aquáticos, estuarinos, marinhos e dulcícolas; e b) Descrição metodológica das medidas de monitoramento da fauna da foz do Rio Doce e ambientes estuarinos e marinhos impactados. II. Realizar e apresentar os resultados, até o último dia útil de maio de 2017, dos estudos para: a) identificação e caracterização do impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho; e b) avaliação do habitat de fundo marinho, incluindo algas calcáreas, rodólitos e corais, nas áreas estuarinas, marinhas e da foz do rio atingidas pelo material oriundo do EVENTO.

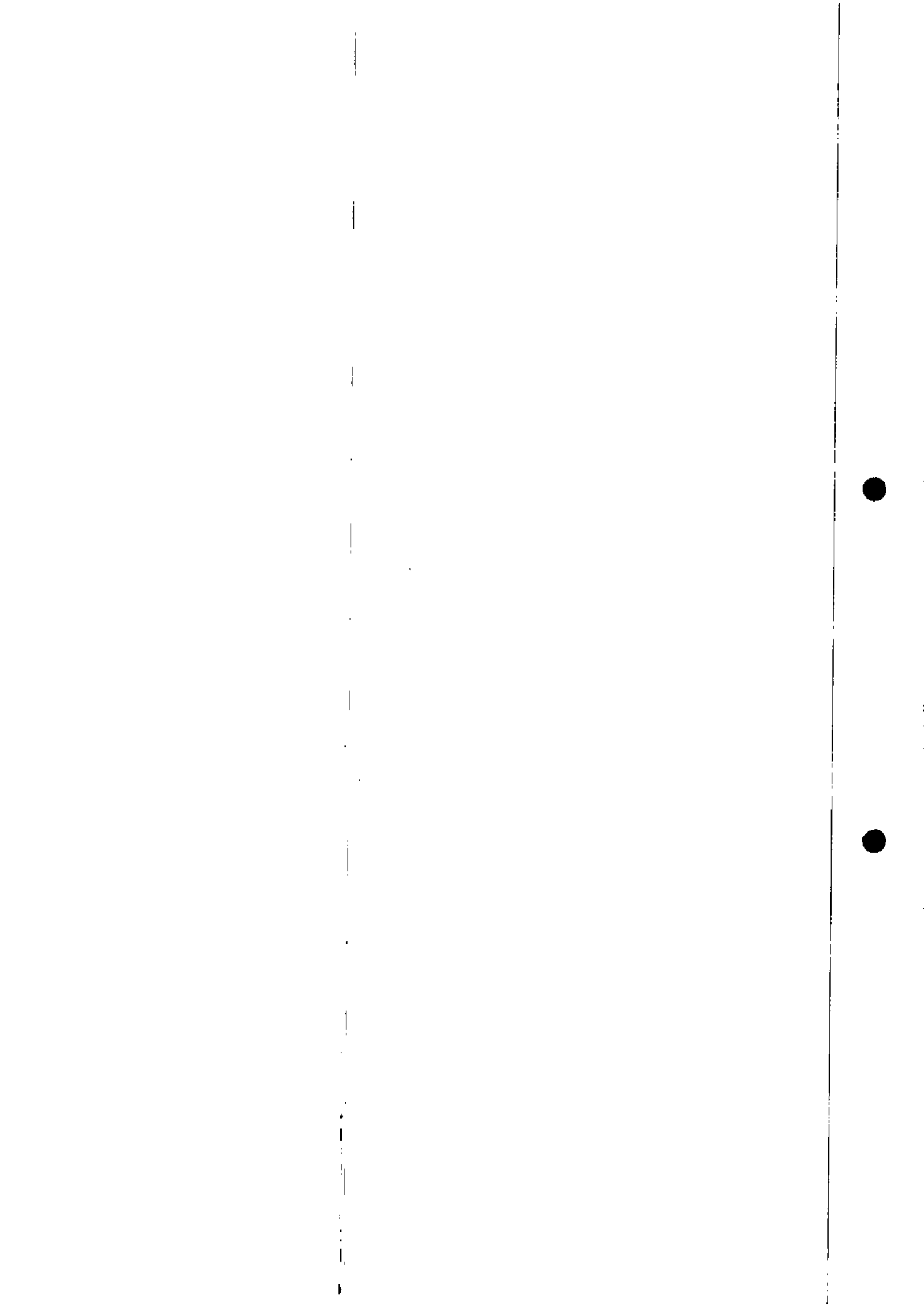


Considerando a complexidade de se realizar análises pré-contratuais de grande número de profissionais e instituições, dos valores envolvidos e demais aspectos concernentes à concretização da parceria com a Rede Rio Doce Mar (Rede), além do tempo necessário para a elaboração de determinados estudos, a FUNDAÇÃO solicitou, em 19 de abril de 2017, a dilação do prazo inicialmente previsto para apresentação dos estudos previstos no item II da Cláusula 165 (SEQ2418-01/2017-GJU - Doc. 01).

A fim de subsidiar a análise do referido pleito de dilação do prazo, a CTBio solicitou, em 03 de maio de 2017, por meio do Ofício SEI nº 116/2017-DIBIO/ICMBio (Doc. 02), que a FUNDAÇÃO apresentasse "*o Plano de Trabalho, devidamente acompanhado de cronograma detalhado*".

Em atendimento ao solicitado no âmbito do Ofício em questão, a FUNDAÇÃO apresentou, em 11 de maio de 2017, o Plano de Trabalho e respectivo cronograma (SEQ2800-01/2017/GJU - Doc. 03), elaborados nos termos da Deliberação CIF nº 25, de 20 de setembro de 2016.

Ocorre que, em 27 de junho de 2017, o CIF emitiu a Deliberação nº 79/2017 (Doc. 04), por meio da qual determinou (1) que a FUNDAÇÃO deverá apresentar, até o dia 06 de julho de 2017, a adequação do Plano de Trabalho para execução do Programa de Monitoramento da Biodiversidade nos ambientes estuarino e marinho, conforme as recomendações da Nota Técnica nº 14/2017/DIBIO/ICMBio, para o cumprimento parcial da Cláusula nº 165 do TTAC, negando-se o pedido de dilação de prazo solicitado anteriormente; (2) que o referido Plano de Trabalho deverá observar o Termo de Referência nº 04, encaminhado à Fundação Renova, em 04 de outubro de 2016, por meio do Ofício SEI nº 175/2016-DIBIO/ICMBio, com exceção do Anexo 2, referente ao ambiente



dulcícola; e (3) o início do monitoramento previsto, imediatamente após a aprovação do Plano de Trabalho pelo CIF.

Assim, em atendimento ao item 1 da Deliberação CIF nº 79/2017 acima, a FUNDAÇÃO vem, tempestivamente, por meio deste, apresentar o Plano de Trabalho para execução parcial da Cláusula 165 ("Plano de Trabalho" – Doc. 05), devidamente ajustado conforme as recomendações da Nota Técnica nº 14/2017/DIBIO/ICMBio (Doc. 06), para o cumprimento dos itens I e II da Cláusula nº 165 do TTAC.

Sendo o que cumpria para o momento, a FUNDAÇÃO RENOVA se mantém à disposição para prestar quaisquer esclarecimentos adicionais que se fizerem necessários.

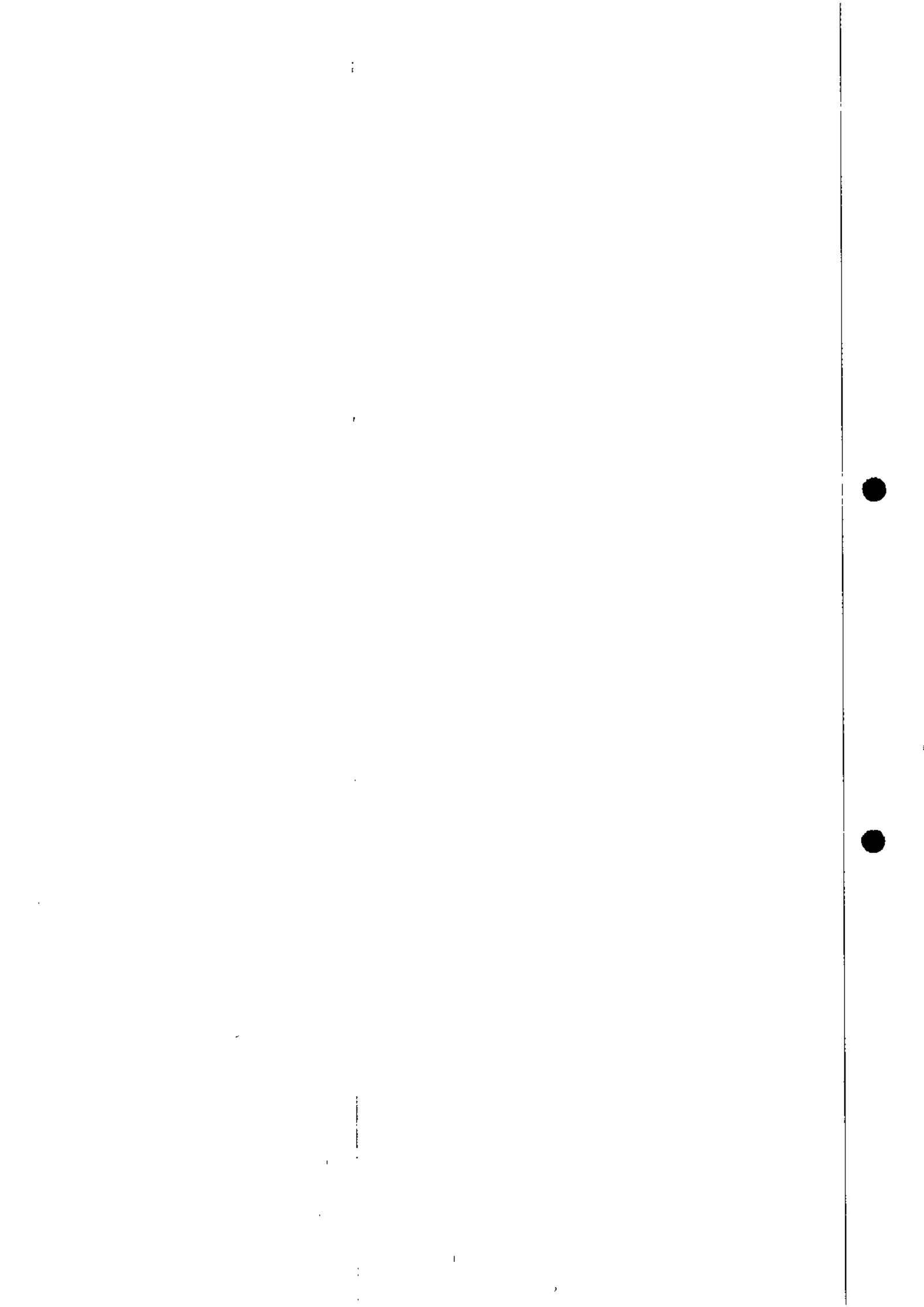
Renovando nossos protestos de estima e consideração, subscrevemos a presente.

Atenciosamente,



FUNDAÇÃO RENOVA
SARA JUAREZ SALES

GERENTE EXECUTIVA DE PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS



DICAD/COAF
Em 19/04/17
As 17:48 horas
Assinatura



FUNDAÇÃO
renova

SEQ2418-01/2017/GJU

Belo Horizonte, 19 de abril de 2017.

AO
COMITÊ INTERFEDERATIVO – CIF
A/C: SRA. SUELY MARA VAZ GUIMARÃES DE ARAÚJO
PRESIDENTE DO COMITÊ INTERFEDERATIVO
SCEN Trecho 2, Edifício Sede, Caixa Postal nº 09566, Brasília/DF
CEP: 70818-900

REF.: *Solicitação de dilação do prazo previsto no Item II da Cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta.*

Prezados Senhores,

A FUNDAÇÃO RENOVA ("FUNDAÇÃO"), pessoa jurídica de direito privado, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 25.135.507/0001-83, Avenida Getúlio Vargas, nº 671, 4º andar, Belo Horizonte/MG, CEP 30.112-021, vem, respeitosamente, por seu representante legal abaixo assinado, expor o quanto segue.

De acordo com o Item II da Cláusula 165¹ do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta, firmado em 2 de março de 2016, no âmbito do Processo nº 0069758-61.2015.4.01.3400, em trâmite perante a 12ª Vara Federal de Seção Judiciária de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais ("TTAC"), a Fundação Renova deverá apresentar os

¹ CLÁUSULA 165: A FUNDAÇÃO deverá elaborar e implementar medidas de monitoramento da fauna da foz do Rio Doce e ambientes estuarinos e marinhos impactados, devendo:

(...)

II. Realizar e apresentar os resultados, até o último dia útil de maio de 2017, dos estudos para:

- a) identificação e caracterização do impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho; e
- b) avaliação do habitat de fundo marinho, incluindo algas calcárias, rodólitos e corais, nas áreas estuarinas, marinhas e da foz do rio atingidas pelo material oriundo do EVENTO;

EMM



resultados dos estudos para caracterização do impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho, bem como para a avaliação do habitat de fundo marinho, incluindo algas calcáreas, rodólitos e corais nas áreas estuarinas, marinha e da foz do rio, atingidas pelo material oriundo do rompimento da Barragem de Fundão.

Para a elaboração dos estudos referentes à Cláusula 165, mais especificamente para atendimento das alíneas "a" do Item I e "a" e "b" do item II, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) apresentou o Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4). O TR4 apresenta detalhadamente os estudos que têm que ser desenvolvidos, as metodologias a serem empregadas e os perfis dos profissionais que serão responsáveis pela condução dos trabalhos.

O TR4 é um termo abrangente em relação aos estudos associados à Cláusula 165 do TTAC, o que evidencia a elevada complexidade dos temas e a alta capacitação dos profissionais que deverão ser deslocados para sua condução. Por este motivo, o TR4 dispõe o seguinte:

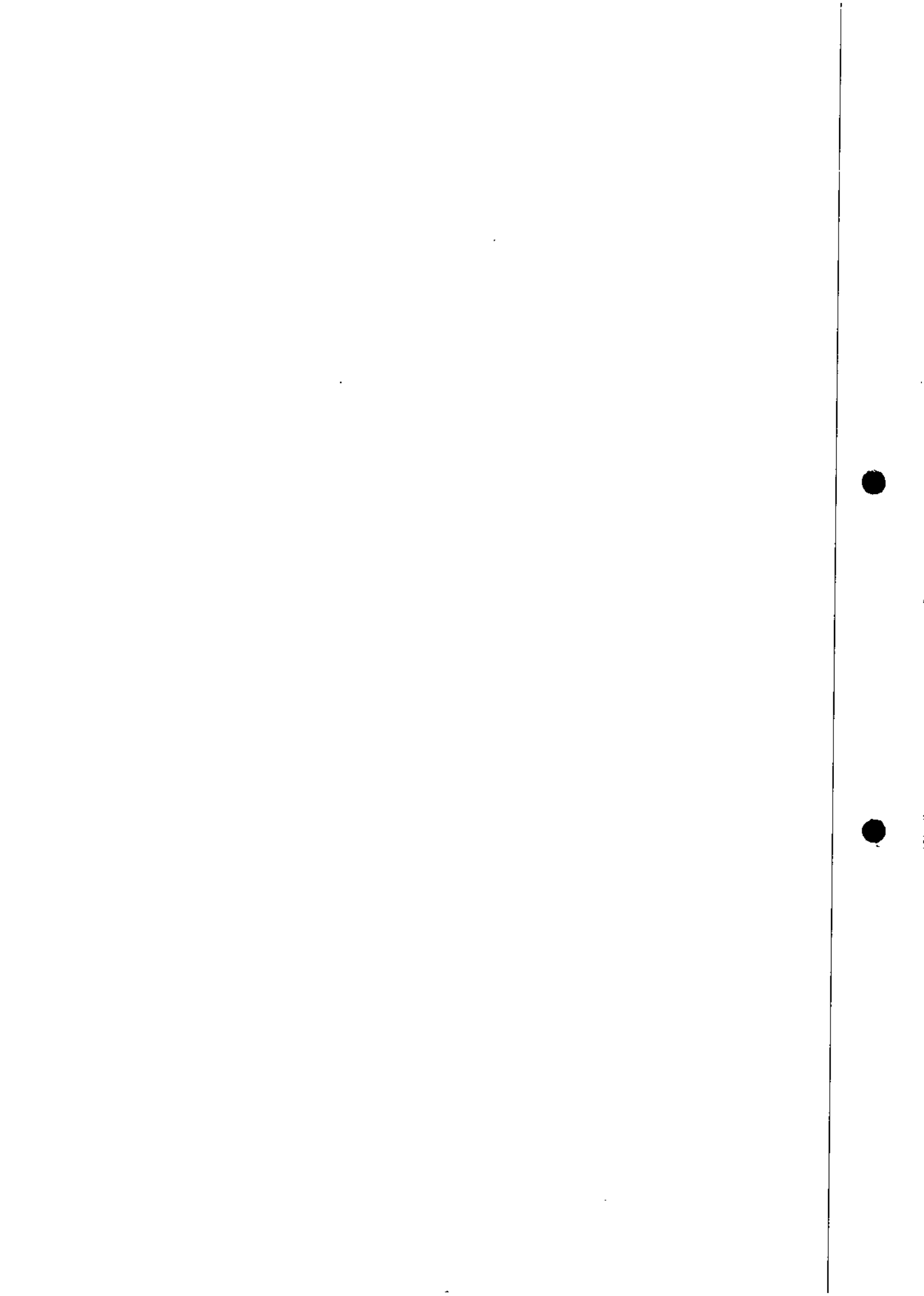
"A instituição ou instituições que irão executar as atividades previstas neste Termo de Referência deverão ser compostas preferencialmente por instituições de pesquisa públicas e locais segundo as diretrizes do Termo de Transação e ajustamento de Conduta, visando:

- criar *expertise* e estruturação local para responder ao evento atual a longo prazo e a eventos semelhantes no futuro;
- credibilidade e transparência dos dados para a sociedade;
- *expertise* comprovada quanto ao desenvolvimento de estudos, geração e difusão de conhecimento, bem como formação de recursos humanos nos temas relacionados aos respectivos componentes específicos e histórico de trabalhos de pesquisa já realizados na região.

Pelo exposto acima, recomenda-se que a execução do Programa se dê pelas equipes de pesquisa já envolvidas nos estudos coordenados anteriormente pelo ICMBio, assegurando a continuidade e aplicação dos mesmos métodos de estudo que vem sendo empregados para avaliação dos impactos à biodiversidade na região e descritos neste Termo de Referência" (grifos nossos).

Em atendimento a estas recomendações, a FUNDAÇÃO está em tratativas com a "Rede Rio Doce Mar" (Rede), consórcio de universidades capitaneado pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). A Rede conta atualmente com mais de 140 pesquisadores de





universidades, institutos e ONGs do Brasil e do exterior, e está capacitada para responder aos questionamentos oriundos do TR4 com a *expertise* solicitada neste documento.

Depreende-se do exposto a grande complexidade técnica, jurídica, tributária e contratual que caracteriza as tratativas entre a FUNDAÇÃO e a Rede, além da previsão de investimentos vultosos em face da abrangência, multiplicidade e prazos dos estudos requeridos no TR4.

Como é de conhecimento deste i. Comitê, as ações da FUNDAÇÃO devem ser balizadas pelos princípios da transparência, lisura e idoneidade. A FUNDAÇÃO é constantemente acompanhada por auditorias internas e externas para garantir a aplicação correta dos recursos nas atividades previstas pelo TTAC.

Dessa maneira, os processos de *Compliance*, jurídicos e de contratações são bastante rigorosos nas averiguações anteriores à celebração de contratos, convênios e parcerias, ainda mais quando se trata de contratação pretendida (i.e., com um único fornecedor) e de valores expressivos.

Diante disso, considerando a complexidade de se realizar análises pré-contratuais de grande número de profissionais e instituições, dos valores envolvidos e demais aspectos concernentes à concretização desta parceria, além do tempo necessário para a elaboração de determinados estudos; a FUNDAÇÃO vem, por meio deste, solicitar a dilação do prazo inicialmente previsto para apresentação dos estudos previstos no item II da Cláusula 165.

São previstos até 90 dias, contados da data de hoje, para se concluir o processo de contratação da Rede Rio Doce Mar e outros 90 dias, contados a partir da data de assinatura do contrato, para a elaboração do referido estudo. Dessa maneira, solicita-se que o prazo inicialmente previsto para atendimento ao item II da Cláusula 165 seja alterado para o último dia útil de outubro de 2017.

Sendo o que cumpria para o momento, a FUNDAÇÃO se mantém à disposição para prestar quaisquer esclarecimentos adicionais que se fizerem necessários e reitera seu compromisso em atender integralmente as obrigações assumidas no TTAC.







Renovando nossos protestos de estima e consideração, subscrevemos a presente.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gilmar Bertoloti", is written over the printed name and title.

FUNDAÇÃO RENOVA
GILMAR BERTOLOTI
GERENTE EXECUTIVO DE PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS



02070.013872/2016-13
Número Sei:1236571



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
DIRETORIA DE PESQUISA, AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE
LQSW 103/104, Bloco "D", Complexo Administrativo - Setor Sudoeste - Bairro Setor Sudoeste - Brasília - CEP 70670350
Telefone: (61) 2028-9055/9394

Ofício SEI nº 116/2017-DIBIO/ICMBio

Brasília, 01 de maio de 2017

Ao Senhor
GILMAR BERTOLOTI
Gerente de Programas Socioambientais
Fundação Renova
Av. Getúlio Vargas, 671 - Funcionários
30112-020 - Belo Horizonte - MG
Assunto: Resposta ao Ofício nº SEQ 02426-01/2017/GJU

Senhor Gerente,

1. Em resposta ao ofício supra citado, informamos que o termo de referência com as orientações para o cumprimento da Cláusula nº 165 foi encaminhado a essa Fundação em 04 de outubro de 2016, por meio do Ofício SEI nº 175/2016-DIBIO/ICMBio.
2. Em cumprimento ao que determina o item XXI da Cláusula 6ª do TTAC, essa Fundação foi orientada a apresentar o plano de trabalho, o que até o momento não ocorreu.
3. Para que possamos melhor analisar o pleito de dilação de prazo proposto, necessitamos que nos seja encaminhado o plano de trabalho, devidamente acompanhado de cronograma detalhado.

Atenciosamente,

MARCELO MARCELINO DE OLIVEIRA

Diretor



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Marcelino De Oliveira, Coordenador CTBIO, em 02/05/2017, às 14:26, conforme art. 1º, III "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador 1236571 e o código CRC 94CFA17C.

Ofício nº 116/2017

Processo: 02070.013872/2016-13



Carina Gondim Montenegro

De: Governança de Programas
Enviado em: quinta-feira, 11 de maio de 2017 09:38
Para: CTBIO CIF - Marcelo Marcelino; Marcelo Marcelino de Oliveira
Cc: Carlos Anselmo Costa Cenachi; Guilherme Almeida Tangari; Jurídico; Bruno Vergueiro Silva Pimenta; Gilmar Bertoloti
Assunto: Resposta ao Ofício SEI nº116/2017
Anexos: 1. SEQ2800 - 01.2017GJU Ofício Resposta Fundacao.pdf; Doc. 01 - ofício 116.2017DIBIO-ICMBIO.PDF; Doc. 02 - Protocolo - Dilação de Prazo Cláusula 165, Item II - 14 12 201....pdf; Doc. 03 - Plano_trabalho_CL_165.pdf; Doc. 04 - Cronograma 165-geral.pdf

Prezado Marcelo Marcelino,

Enviamos em anexo ofício SEQ2800-01/2017/GJU apresentando o plano de trabalho (Doc.03) e respectivo cronograma (Doc.04) referentes a cláusula 165, em resposta ao ofício SEI nº116/2017(Doc.01).

Essa documentação encontra-se disponível também no IDEALS através do link

<https://www4.idealsvdr.com/v3/1398136>.

Paralelamente, nosso Departamento Jurídico está protocolando esse documento junto à CTBio.

Colocamo-nos à disposição para esclarecer quaisquer informações adicionais que sejam necessárias.

Atenciosamente,

Eloá Ribeiro Lacerda
Governança de Programas
(31) 98468-1839
eloa.lacerda.crtf@fundacaorenova.org





COMITÊ INTERFEDERATIVO

Deliberação nº 79, de 27 de junho de 2017

Estabelece prazo para a Renova adequar o Plano de Trabalho do Programa de Monitoramento da Biodiversidade nos ambientes estuarino e marinho, conforme as recomendações da Nota Técnica nº 14/2017/DIBIO/ICMBio.

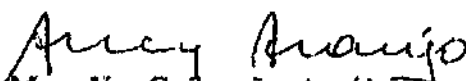
Em atenção ao TERMO DE TRANSAÇÃO E DE AJUSTAMENTO DE CONDUTA - TTAC, entre União, estados de Minas Gerais, Espírito Santo e as empresas Samarco Mineração S/A, Vale S/A e BHP Billiton Brasil LTDA.; e

Considerando o definido na Cláusula 165 do TTAC, na Nota Técnica nº 14/2017/DIBIO/ICMBio de 19/05/2017, e nas atribuições deste órgão colegiado, o **COMITÊ INTERFEDERATIVO** delibera:

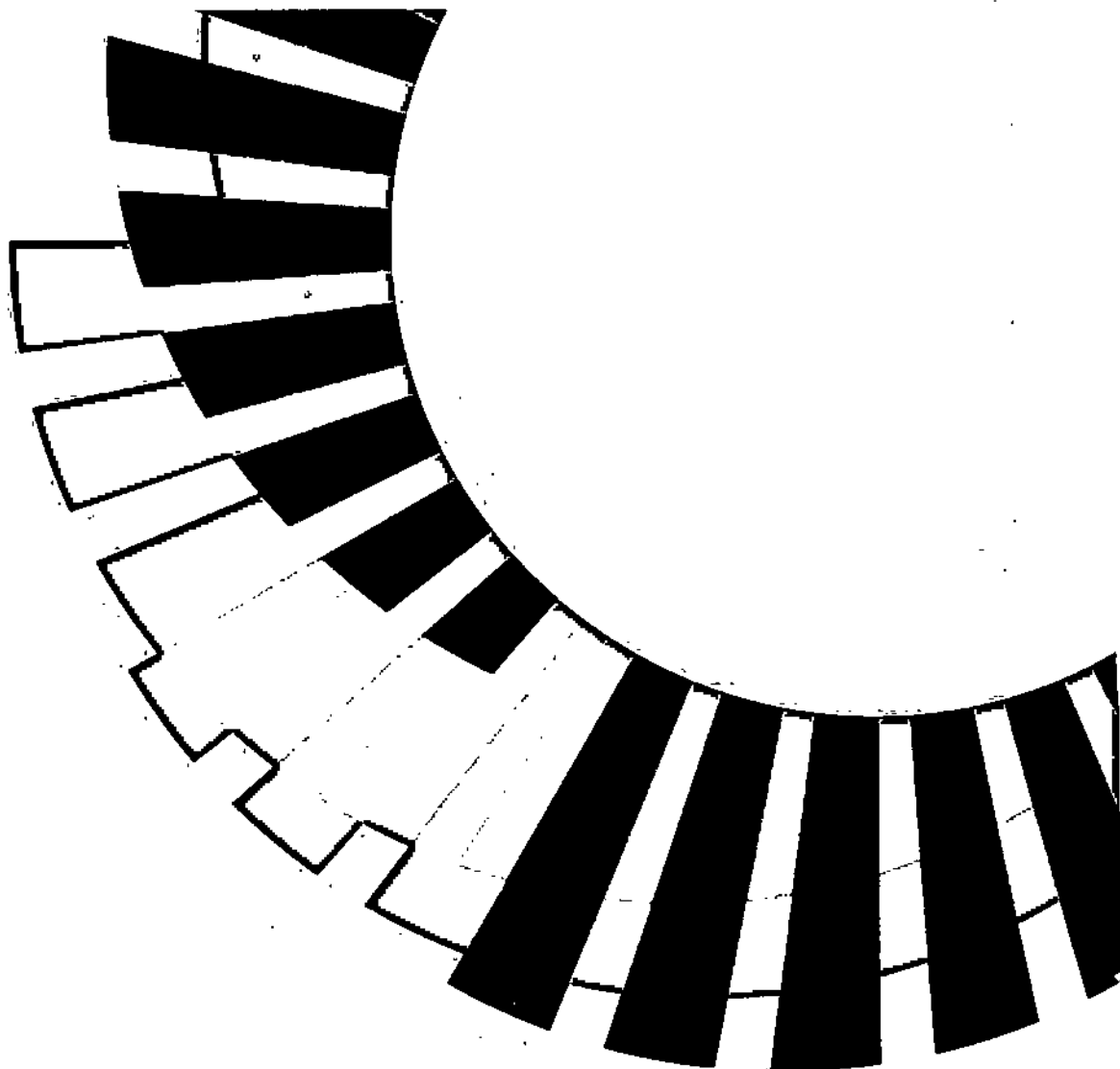
Deliberação do CIF:

- 1) A Fundação Renova deverá apresentar, até o dia 06 de julho de 2017, **adequação do Plano de Trabalho para execução do Programa de Monitoramento da Biodiversidade nos ambientes estuarino e marinho**, conforme as recomendações da Nota Técnica nº 14/2017/DIBIO/ICMBio, para o cumprimento parcial da Cláusula nº 165 do TTAC, negando-se o pedido de dilação de prazo solicitado anteriormente.
- 2) O Plano de Trabalho supracitado deverá observar o Termo de Referência nº 04, encaminhado à Fundação Renova, em 04 de outubro de 2016, por meio do Ofício SEI nº 175/2016-DIBIO/ICMBio, com exceção do Anexo 2, referente ao ambiente dulcícola.
- 3) Fica determinado o início do monitoramento previsto, imediatamente após a aprovação do Plano de Trabalho pelo CIF, sob pena de aplicação das sanções previstas no TTAC.

Brasília, 27 de junho de 2017.


Suely Mara Vaz Guimarães Araújo
Presidente do COMITÊ INTERFEDERATIVO





FUNDAÇÃO
renova

Plano de Trabalho

**Atendimento à Cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de
Conduta**

Julho/2017



EQUIPE TÉCNICA RESPONSÁVEL POR ESTE PLANO DE TRABALHO

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



SUMÁRIO

1. SUMÁRIO EXECUTIVO	1
2. APRESENTAÇÃO	2
3. DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO	4
3.1 Item II da Cláusula 165.....	4
3.2 Anexo 1 - Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas	5
3.3 Anexo 3 - Estudo e monitoramento ambiental no rio Doce, área estuarina e marinha (Área Ambiental 1)	36
3.4 Anexo 4 - Monitoramento de potenciais impactos do rejeito de minério de ferro na praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce	54
3.5 Anexo 5 - Alterações ecológicas na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce	61
3.6 Anexo 6 - Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio Doce, Plataforma Continental e áreas protegidas adjacentes	71
3.7 Anexo 7 - Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha e estuarina.....	101
3.8 Anexo 8 - Monitoramento da sedimentação no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e regiões relacionadas	116
4. CRONOGRAMA	124
5. REFERÊNCIAS	125



1. SUMÁRIO EXECUTIVO

O presente Plano de Trabalho é apresentado pela Fundação Renova em atendimento à Cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta (TTAC) e à Deliberação nº 79 do Comitê Interfederativo (CIF), de 27 de junho de 2017. Tem como objetivo apresentar as metodologias propostas para cumprimento das alíneas “a” e “b” do item II da Cláusula 165 e dos Anexos do Termo de Referência 4 - Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática (TR4), e seus respectivos cronogramas de execução.

A referida Deliberação determina que a Fundação Renova apresente adequação do Plano de Trabalho conforme as recomendações da Nota Técnica nº 14/2017-DIBIO/ICMBio. Esta Nota Técnica considerou que “os questionamentos apresentados pela Fundação Renova aos TRs aprovados para consecução da Cláusula 165 são (...) desprovidos de suficiente fundamentação”. Por isso, o Plano de Trabalho ora apresentado caracteriza-se pela total aderência ao proposto no TR4, sendo feitas algumas propostas de modificações em metodologias e premissas com o objetivo de contribuir para o aprimoramento técnico das ações previstas ao longo do monitoramento e buscar respostas assertivas sobre os impactos causados aos ambientes e à biota estuarina e marinha.

Ressalta-se que este Plano de Trabalho não descreve as ações referentes ao Anexo 2 do TR4, que versa sobre o Estudo e Monitoramento do Ambiente Dulcícola da Área Ambiental I, devido à decisão expressa no item 2 da Deliberação nº 79 do CIF, transcrita a seguir para contextualização:

“2) O Plano de Trabalho supracitado deverá observar o Termo de Referência nº 04, encaminhado à Fundação Renova, em 04 de outubro de 2016, por meio do Ofício SEI nº 175/2016-DIBIO/ICMBio, com exceção do Anexo 2, referente ao ambiente dulcícola”.



2. APRESENTAÇÃO

Neste Plano são apresentadas as metodologias a serem utilizadas para cumprimento da Cláusula 165 do TTAC, em acordo com o item II, alíneas “a” e “b” da referida Cláusula e com o TR4. O termo mencionado foi elaborado pelo ICMBio e recebido pela Fundação Renova em 20/10/2016. O TR4 é bastante abrangente em seu conteúdo: apresenta oito anexos que tratam de diferentes linhas de estudo para monitoramento da biodiversidade aquática, análises ecotoxicológicas e de bioacumulação e de qualidade de água e sedimentos. No entanto, por decisão da Deliberação nº 79 do CIF, este Plano de Trabalho não contempla o Anexo 2 - Estudo e Monitoramento do Ambiente Dulcícola da Área Ambiental I.

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

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



Na apresentação de cada Anexo, a Fundação Renova propõe alterações das diretrizes do TR4, seja para ordenar o processo de formulação de hipóteses sobre a ocorrência de impactos ou para otimizar os recursos a serem disponibilizados para as atividades. O objetivo destes ajustes é contribuir para o aprimoramento técnico das ações previstas ao longo do monitoramento, de forma a buscar respostas assertivas sobre os impactos causados aos ambientes e à biota estuarina e marinha.

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

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

A avaliação acima citada será realizada por pesquisadores diretamente envolvidos nos monitoramentos, pesquisadores externos e Fundação Renova, cujo produto será submetido à Câmara Técnica de Biodiversidade para avaliação e orientações técnicas e envio ao CIF.

Por último, as coordenadas dos pontos de amostragem apresentadas no TR4 possuem notações diferentes, ora sendo apresentadas em coordenadas decimais, ora em coordenadas geográficas, ora em UTM. Neste Plano de Trabalho as coordenadas foram convertidas para o *datum* SIRGAS2000 e são apresentadas sempre em UTM, da forma como serão apresentadas nos relatórios dos monitoramentos.



3. DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO

3.1 Item II da Cláusula 165

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

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

Para a elaboração deste estudo, serão selecionados dados sobre:

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

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



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

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

3.2.1 Objetivos

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

Ressalta-se que os objetivos do Anexo 1 mencionam avaliações e análises nos ambientes e organismos de água doce. A seleção de sítios de amostragem e metodologias de coleta nos ambientes dulcícolas é feita no Anexo 2 do TR4, que foi retirado do escopo deste Plano de Trabalho pela Deliberação nº 79 do CIF. Desta maneira, este Plano de Trabalho descreve apenas os parâmetros e aspectos do



Anexo 1 referentes aos ambientes estuarinos e marinhos. A coleta dos parâmetros no ambiente dulcícola irá aguardar a revisão do Anexo 2.

3.2.2 Área de Estudo

Conforme definido pelo Anexo 1 do TR4, as amostras de água, sedimento e organismos seriam coletadas na bacia do rio Doce, na região estuarina, na região costeira e nas praias adjacente à sua foz. Com a exclusão dos ambientes dulcícolas feita pela Deliberação nº 79 do CIF, 22 dos 26 pontos para monitoramento em água doce citados no Anexos 1 e 2 não são considerados neste Plano de Trabalho. São mantidos os pontos 23 a 26, considerados como pertencentes à região estuarina (Quadro 1).

Quadro 1 - Pontos de amostragem do Anexo 1 - TR4 na região estuarina.

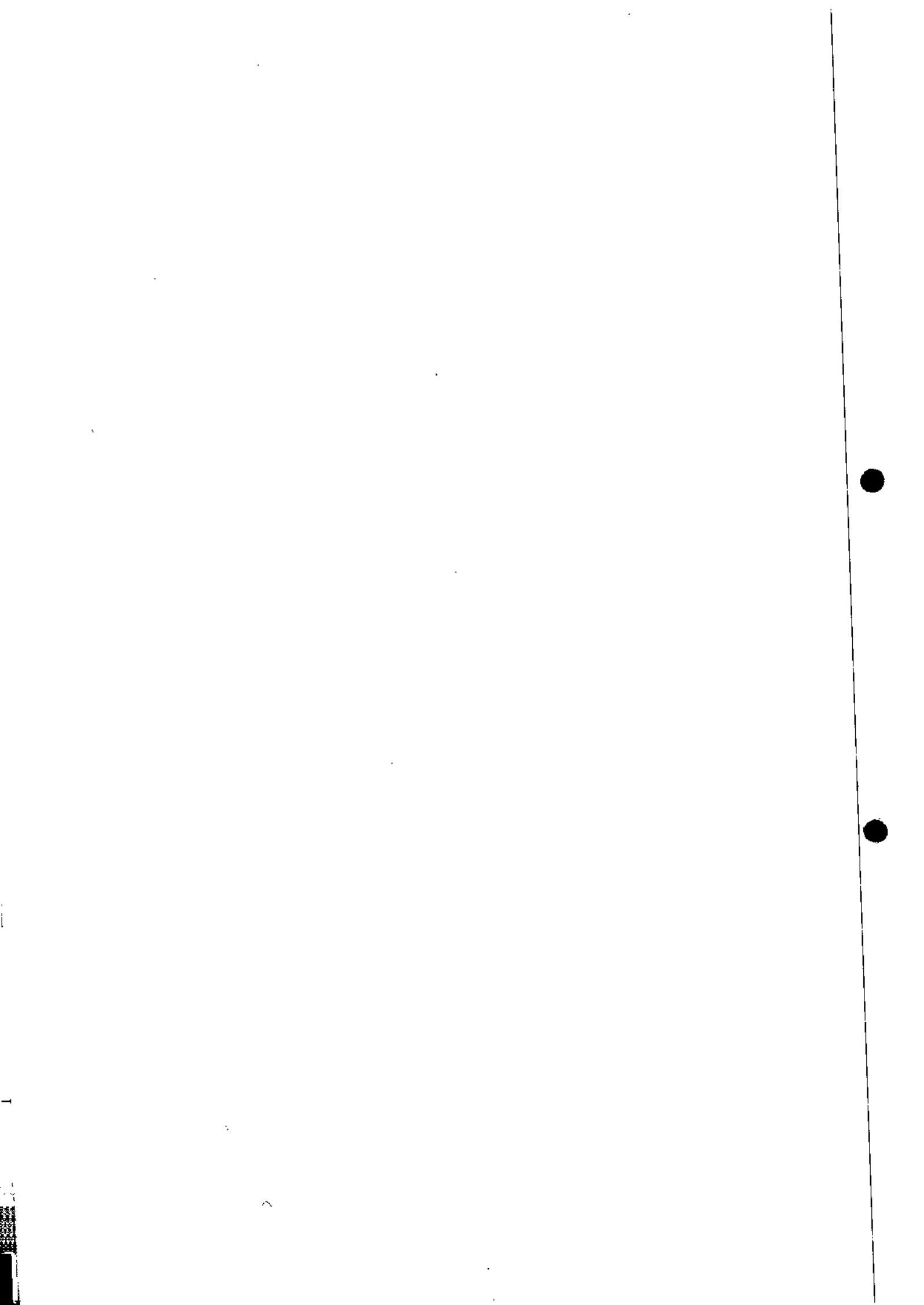
Ponto	Local	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
23	Lagoa do Areão	411472,58	7835831,65
24	Lagoa do Areal	413154,34	7834176,33
25	Lagoa Monsaraz	415912,93	7837161,08
26	Foz do rio Doce	414079,86	7828234,12

Fonte: Anexo 1, TR4.

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

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

Localidade	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Vitória (ES)	373370,92	7759040,18
	378037,01	7755589,67



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

Fonte: Anexo 1, TR4.

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



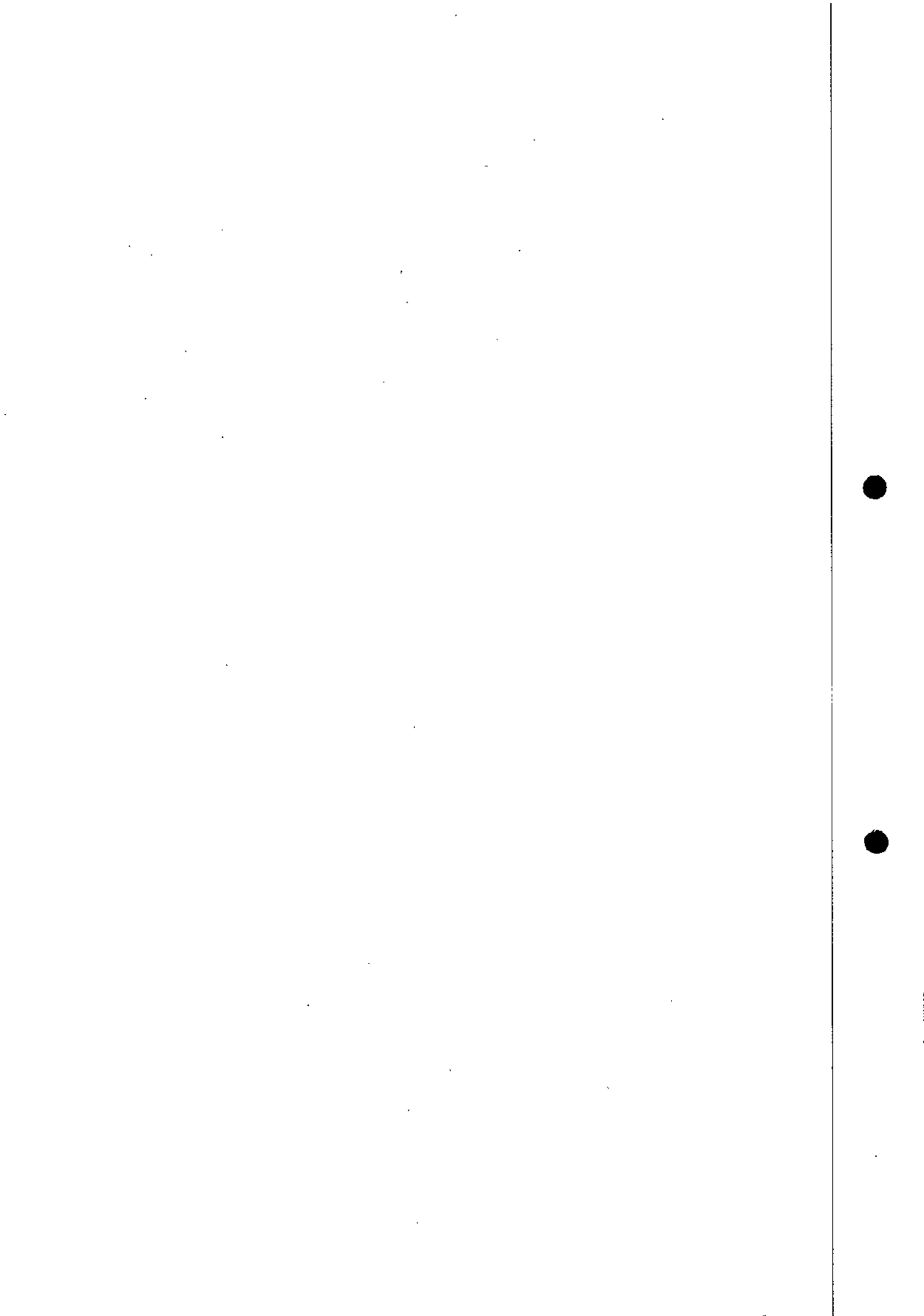
Quadro 3 - Pontos de amostragem do Anexo 1 - TR4 nas praias adjacentes à foz do rio Doce.

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

As análises ecotoxicológicas em aves merecem delimitação de área de estudo particular por parte do Anexo 1. Isto é justificado pela variedade de hábitos destes animais, que se distribuem por regiões límnicas, estuarinas, costeiras e marinhas, e pela heterogeneidade ambiental das áreas afetadas. Dessa maneira, o Anexo 1 determina que as tendências nas eventuais concentrações de contaminantes em tecidos de aves sejam monitoradas em 13 áreas de amostragem distintas, sendo oito ao longo do rio Doce, uma em cada um dos ambientes estuarinos, de manguezais e costeiros, e duas áreas de amostragem marinhas. O Anexo 1 não fornece as coordenadas de localização destas áreas de amostragem, mas apresenta um mapa com polígonos delimitando as seguintes áreas:

- Rio Gualaxo do Norte
- Rio do Carmo (trecho afetado)
- Rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce)
- Rio Doce (à montante da foz do rio Corrente)
- Rio Doce (à montante da foz do rio Suaçuí Grande)
- Rio Doce (à montante da foz do rio Manhuaçu)



- Rio Doce (entre Colatina e Linhares)
- Rio Doce (entre Linhares e Regência)
- Estuário do rio Doce (Linhares)
- Manguezal na foz do rio Doce (Linhares)
- Costa adjacente à foz do rio Doce (norte e sul)
- Área marinha (amostragem a bordo)
- Abrolhos

Observa-se que as análises ecotoxicológicas em aves coincidem em parte com o escopo com o Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO, que trata dos monitoramentos da fauna e flora terrestre no âmbito da Notificação IBAMA 678322-E, de 03/12/2015. Este Parecer foi enviado à Samarco em 08/06/2017 e seu Plano de Trabalho protocolado no IBAMA-ES em 23/06/2017. Sugere-se que as análises ecotoxicológicas de aves na bacia do rio Doce sigam as premissas e malha de amostragem propostas no Plano de Trabalho para atendimento ao Parecer Técnico mencionado. Análise das malhas de amostragem do Anexo 1 e do Parecer Técnico mostram que as áreas propostas para amostragem de aves continentais nos dois documentos são muito similares, permitindo a conjugação dos esforços sem prejuízo aos resultados esperados.

Para as áreas de amostragem de aves referentes ao estuário do rio Doce (Linhares), manguezal na foz do rio Doce (Linhares), costa adjacente à foz do rio Doce (norte e sul), área marinha (amostragem a bordo) e Abrolhos, seriam mantidas as propostas do Anexo 1.

3.2.3 Metodologias e Periodicidade

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



trópicos das áreas estudadas (dulcicola, estuária e marinha). É importante a preferência por organismos nativos típicos de cada área e que tenham procedimentos de ensaio já normalizados. Além disto, o Anexo 1 define a utilização de ensaios com espécies já normalizadas. O fato de espécies ser um modelo consagrado para estudos de ecotoxicologia experimental envolvendo ovos, embriões e larvas. Porém, isso não exclui a necessidade de ensaios com espécies nativas

• Amostras de água salgada

São coletadas 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.

Apesar da retida do Anexo 2 do escopo deste plano de Trabalho, conserva-se que a seleção de organismos-álvo para análises ecotoxicológicas é realizada no Anexo 1. Destaca-se que tais organismos só serão coletados após publicação do Anexo 2 revisado, de forma que seja conhecida a malha de amostragem e métodos de coleta para o Rio Doce.

Nos ambientes dulcícolas serão obtidas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de diatomáceas, girinos de anfíbios, uma espécie de camarão de água doce, exemplares de lucarna e piranha (representando os peixes carnívoros), exemplares de Pinelodus maculatus (peixe herbívoro) e exemplares de caracá (representando as espécies herbívoras).

Além disto, determina-se a coleta de exemplares das seguintes espécies nativas, comuns na baía do Rio Doce: *Hoplias melabaricus* (pacu), com um espécime de *Colomesus asotus* (tatuí), *Geopagus brasiliensis* e *Astyanax aff. alburnus* (dourado). Também são selecionadas as seguintes espécies de interesse comercial: *Prochilodus lineatus*, *Lopholatilus chamaeleonticeps*, *Sardinops brasiliensis* e *Prochilodus costatus*.

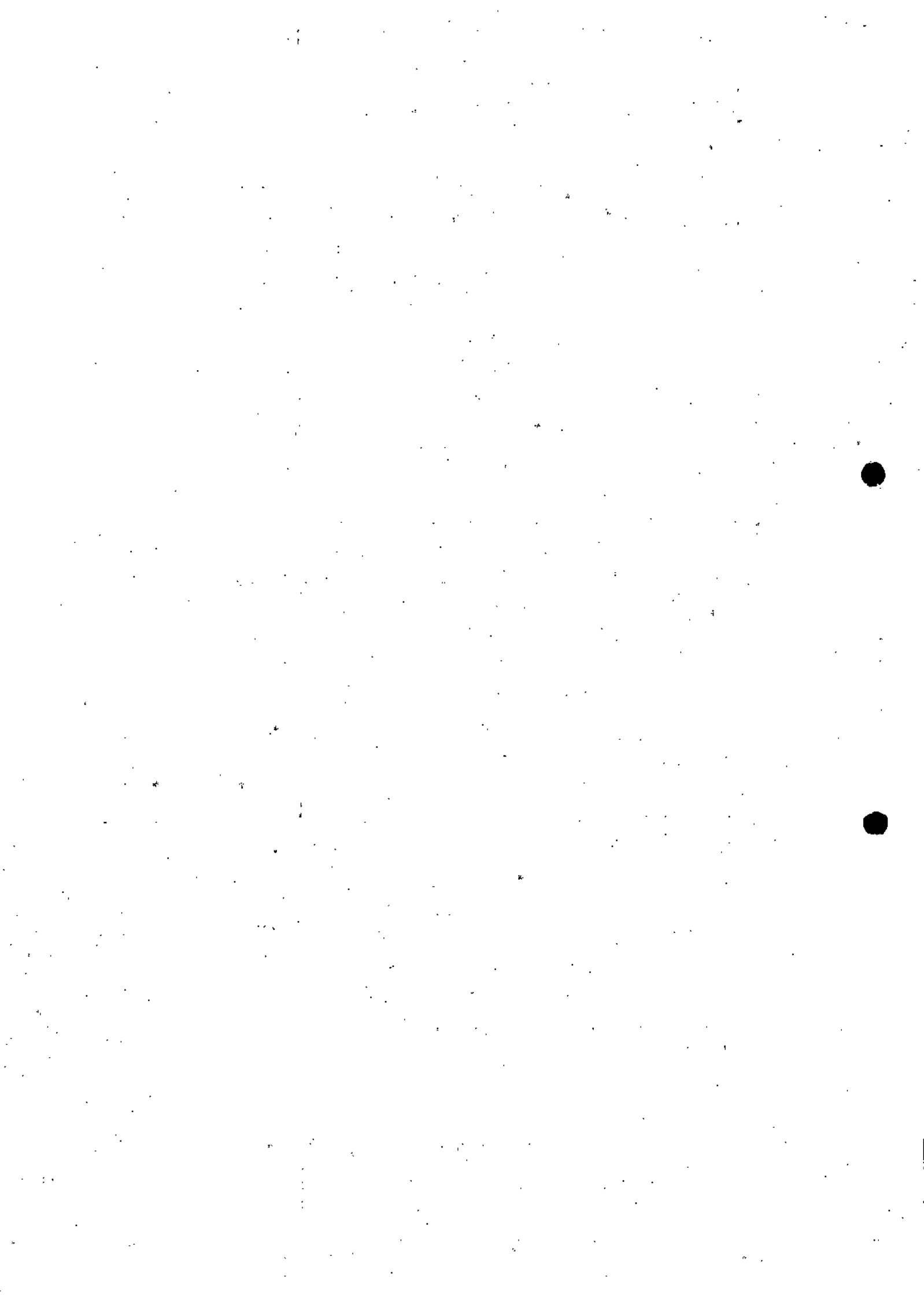
Destaca-se que *Prochilodus vimbooides* e *Lophiosilurus alexandri* são espécies de peixes ameaçadas de extinção conforme a lista nacional vigente (MMA, 2014). Por isso, sugere-se a adoção de menor número de exemplares destas espécies para as análises propostas no Anexo 1 ou sua retirada das espécies selecionadas.

No ambiente estuarino (cujos pontos são discriminados no Quadro 1), serão obtidas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, de uma espécie de camarão e das espécies de peixes *Eucinostomus* sp. (carapicu), *Pachyurus adspersus* (corvina), *Pomadasys ramosus* (bicudo) e o chamado bagre-caçari.

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

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

A hemolinfa dos crustáceos e o sangue dos peixes serão preparados em seguida para análises de biomarcadores de dano ao material genético. Todas as amostras coletadas para análises de concentrações de metais serão acondicionadas em frascos



plásticos devidamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ, congeladas e transportadas para o laboratório, permanecendo congeladas em *freezer* comum. Nestas amostras serão analisadas as concentrações de Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

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

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

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

SECRET

1. This document contains information which is classified "Secret" because its disclosure would be injurious to the national defense.

2. The information is being furnished to you for your information and use only. It is not to be distributed outside your organization.

3. This information is being furnished to you under the authority of the Department of Defense. It is being furnished to you on a "need-to-know" basis.

4. This information is being furnished to you under the authority of the Department of Defense. It is being furnished to you on a "need-to-know" basis.

5. This information is being furnished to you under the authority of the Department of Defense. It is being furnished to you on a "need-to-know" basis.

imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou *ultrafreezer* (-80°C), para análise posterior de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

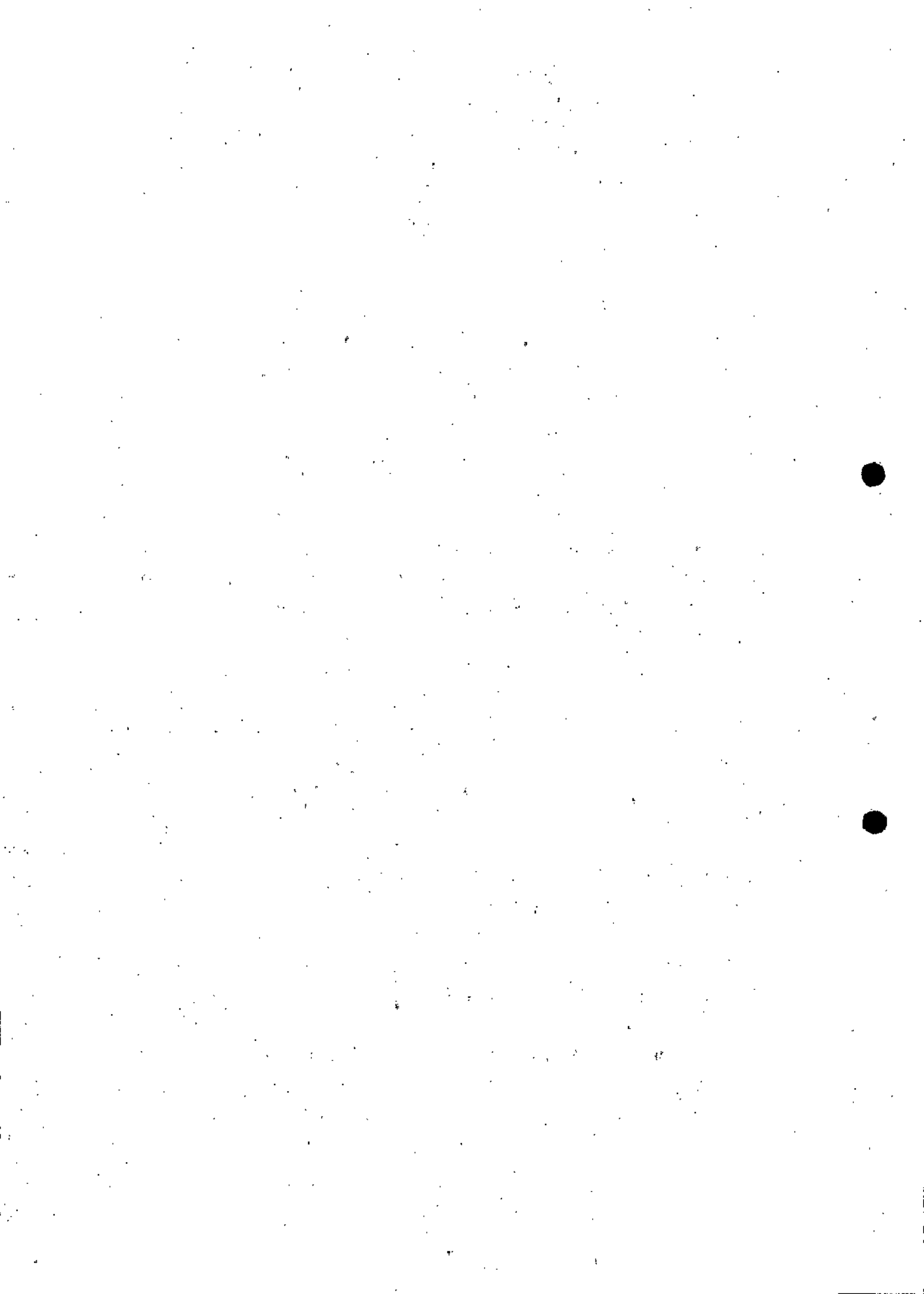
Nos pontos de amostragens das praias (apresentados no Quadro 3) serão coletados exemplares de uma espécie de poliqueto, uma de anfípodo e do isópodo *Excirolana* sp. (todos por meio da triagem manual do sedimento) e do caranguejo *Ocypode quadrata* (por coleta manual). Para as análises de concentrações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

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

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

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

Para as análises de concentrações de metais na biota de manguezais, serão coletados 10 indivíduos de cada espécie mencionada no parágrafo acima em cada ponto de amostragem. Os procedimentos de biometria e obtenção das amostras (hemolinfa, músculo, brânquias e hepatopâncreas) seguem o descrito anteriormente



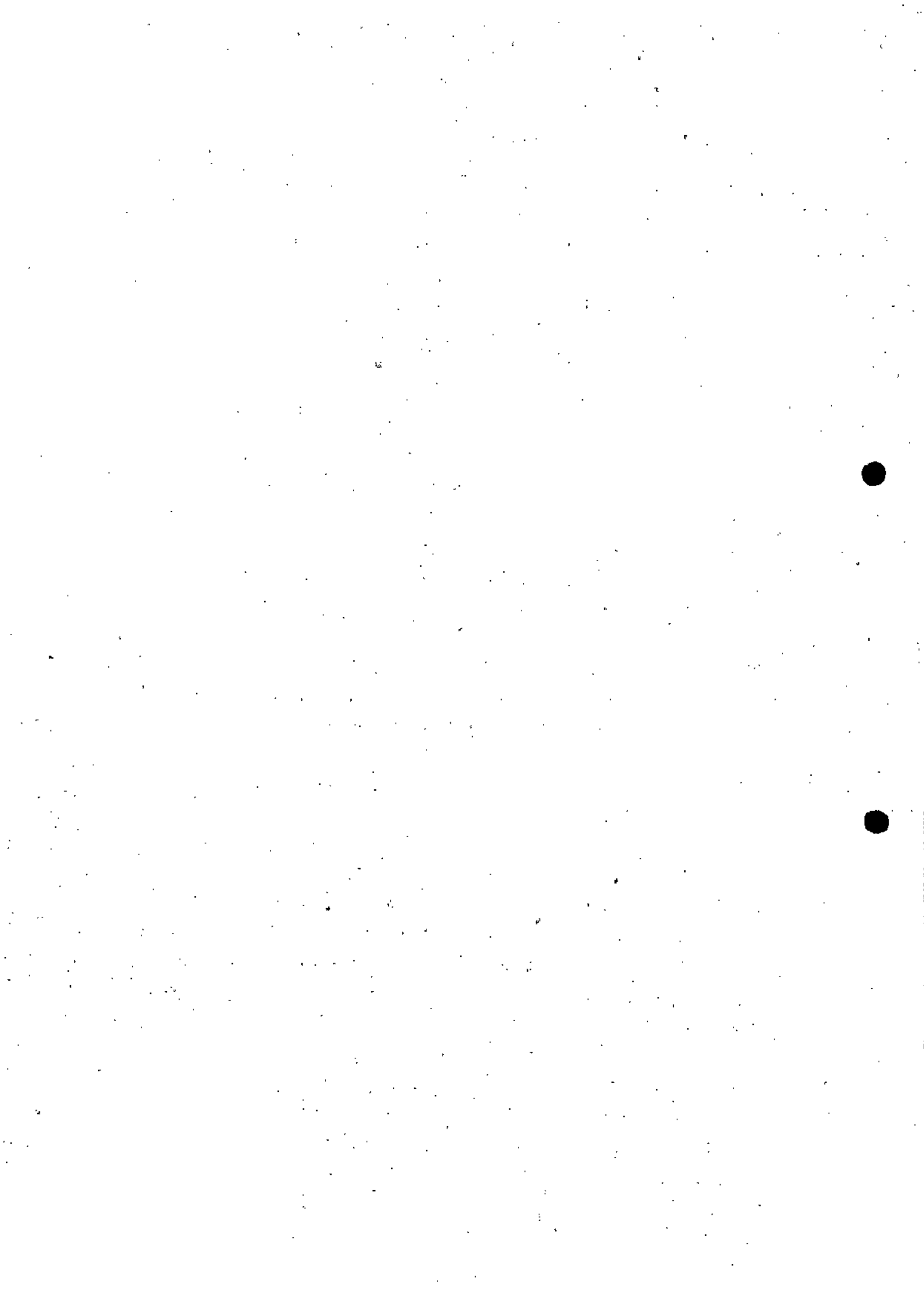
para as análises de concentrações de metais e de biomarcadores de dano no material genético para crustáceos dos outros ambientes. Os metais a serem analisados também serão os mesmos.

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

Sugere-se rever a utilização do caranguejo guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) ou o quantitativo de exemplares necessários para as análises de metais e biomarcadores propostas no Anexo 1. O guaiamum consta da Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2014) na categoria “ criticamente em Perigo”, justamente a que denota maior atenção para esforços de conservação. Define-se a coleta de 100 exemplares da espécie por semestre (10 exemplares por ponto x 10 pontos de amostragem). Com cinco anos de duração previstos para os monitoramentos, pode-se chegar à cifra de 1.000 guaiamuns coletados. Outra análise define a coleta de 10 fêmeas ovadas por ano, comprometendo os esforços reprodutivos de 50 exemplares (cinco exemplares em cada ponto de monitoramento).

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

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



presença de sedimentos e/ou de impactos nas diferentes áreas amostradas, que poderiam ser rastreados em áreas adjacentes.

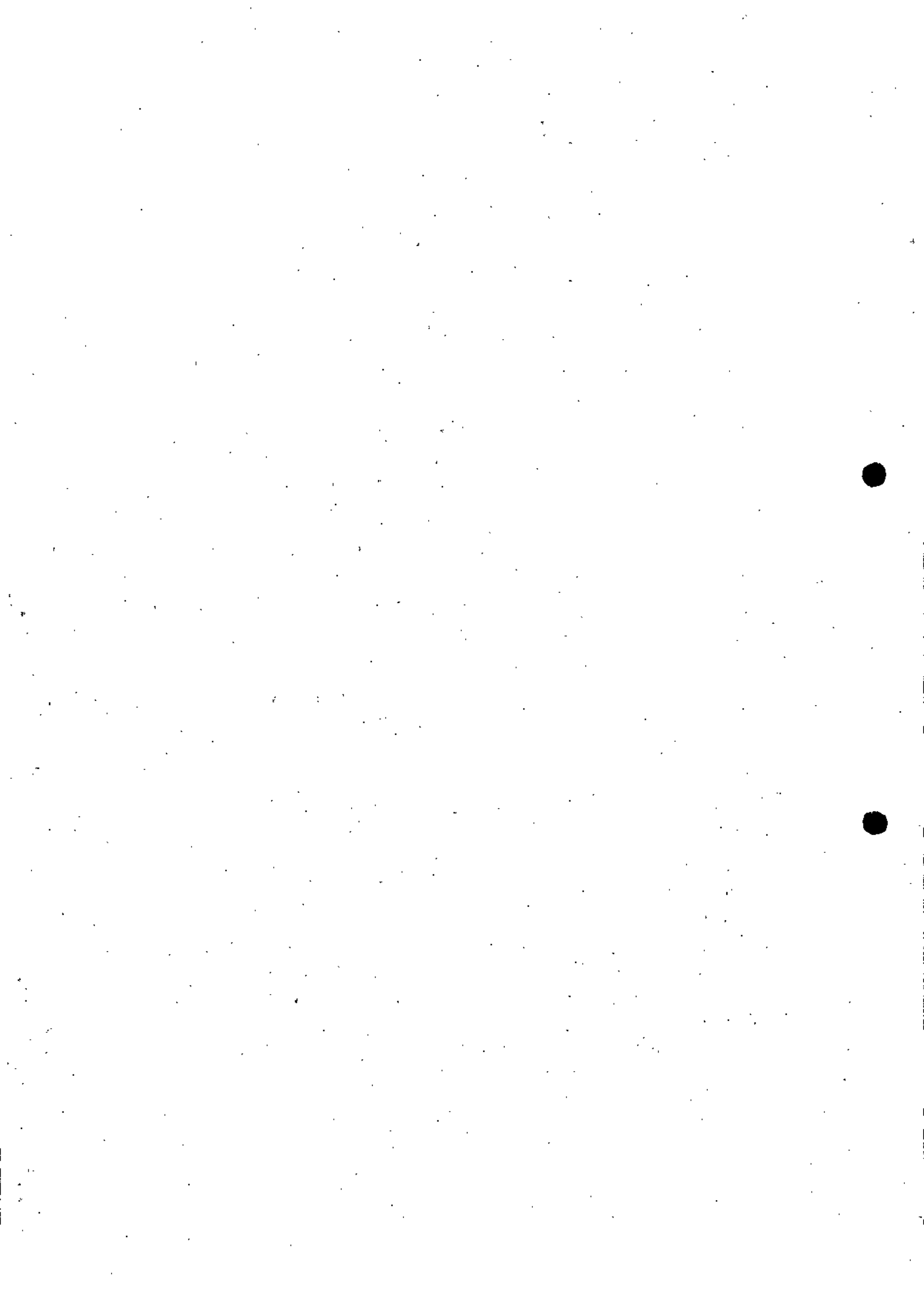
- Coleta de amostras de aves

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

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

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

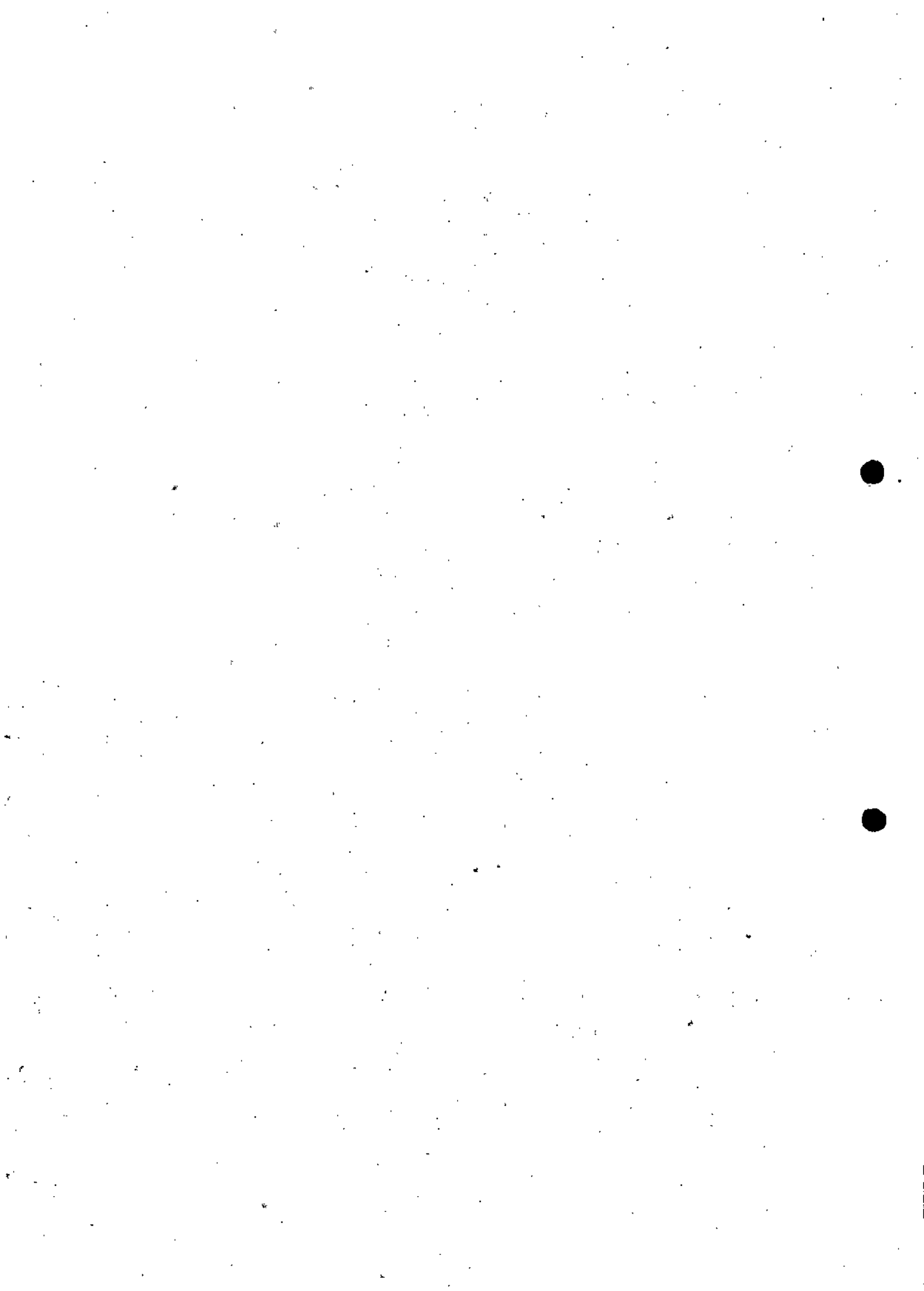


As espécies que terão exemplares capturados serão selecionadas com base na abundância em cada área de amostragem, devendo ser priorizadas as mais abundantes para evitar impactos populacionais e, ao mesmo tempo, permitir a obtenção de amostras das mesmas espécies ao longo de todo o período de monitoramento.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

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

Os espécimes capturados terão coletadas amostras de sangue (máximo de 1% da massa corporal em microtubo ou frasco de 1,5 ml, sem anticoagulante) e penas de contorno (de cinco a 10 penas). Para as aves encontradas mortas, o sangue deve ser obtido nos coágulos cardíacos. Amostras de sangue serão resfriadas em campo e congeladas assim que possível. As penas serão armazenadas a seco em sacos plásticos vedados (*zip-loc*).

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



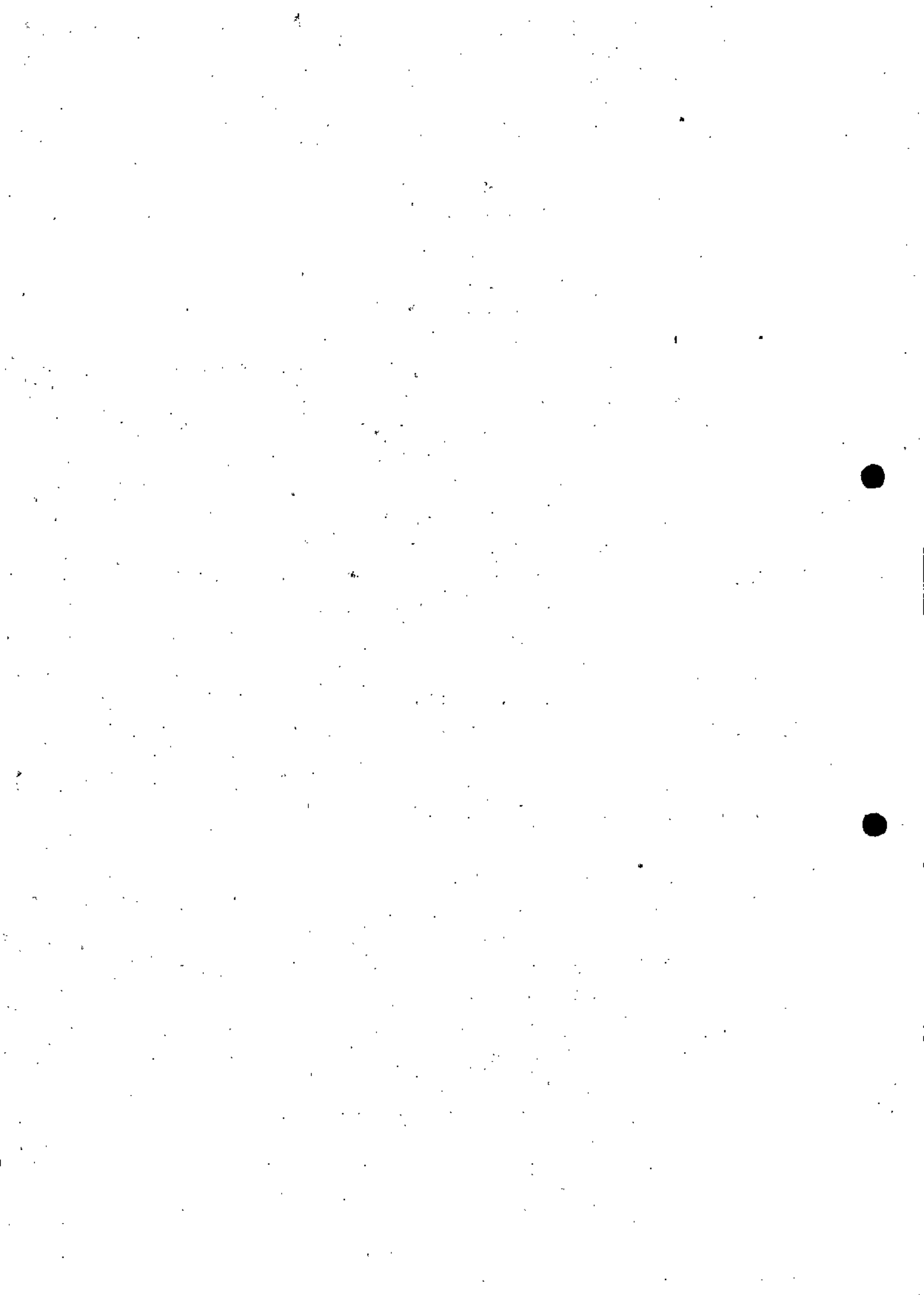
precisão ou reconstituída, absoluta e relativa (M e M%, respectivamente). Os parâmetros para análise de conteúdo estomacal devem seguir Faria *et al.* (2016).

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

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

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

Amostras de quelônios e cetáceos para análises de contaminantes devem ser obtidas por meio de animais encontrados encalhados no litoral norte capixaba. Quando acionadas sobre algum evento deste tipo, a equipe técnica deverá obter as seguintes informações locais: condição climática e de maré, coordenadas, identificação da espécie, existência de marcas de petrechos de pesca, registro fotográfico e biometria. O monitoramento das praias será realizado em parceria com o Programa de Monitoramento de Praias (PMP), em desenvolvimento pela PETROBRAS, por meio



de parceria a ser firmada entre a empresa e a Fundação Renova. O monitoramento de quelônios (Anexo 6), já contratado pela Fundação Renova junto à Fundação Pró-Tamar, também poderá auxiliar na notificação de animais encalhados.

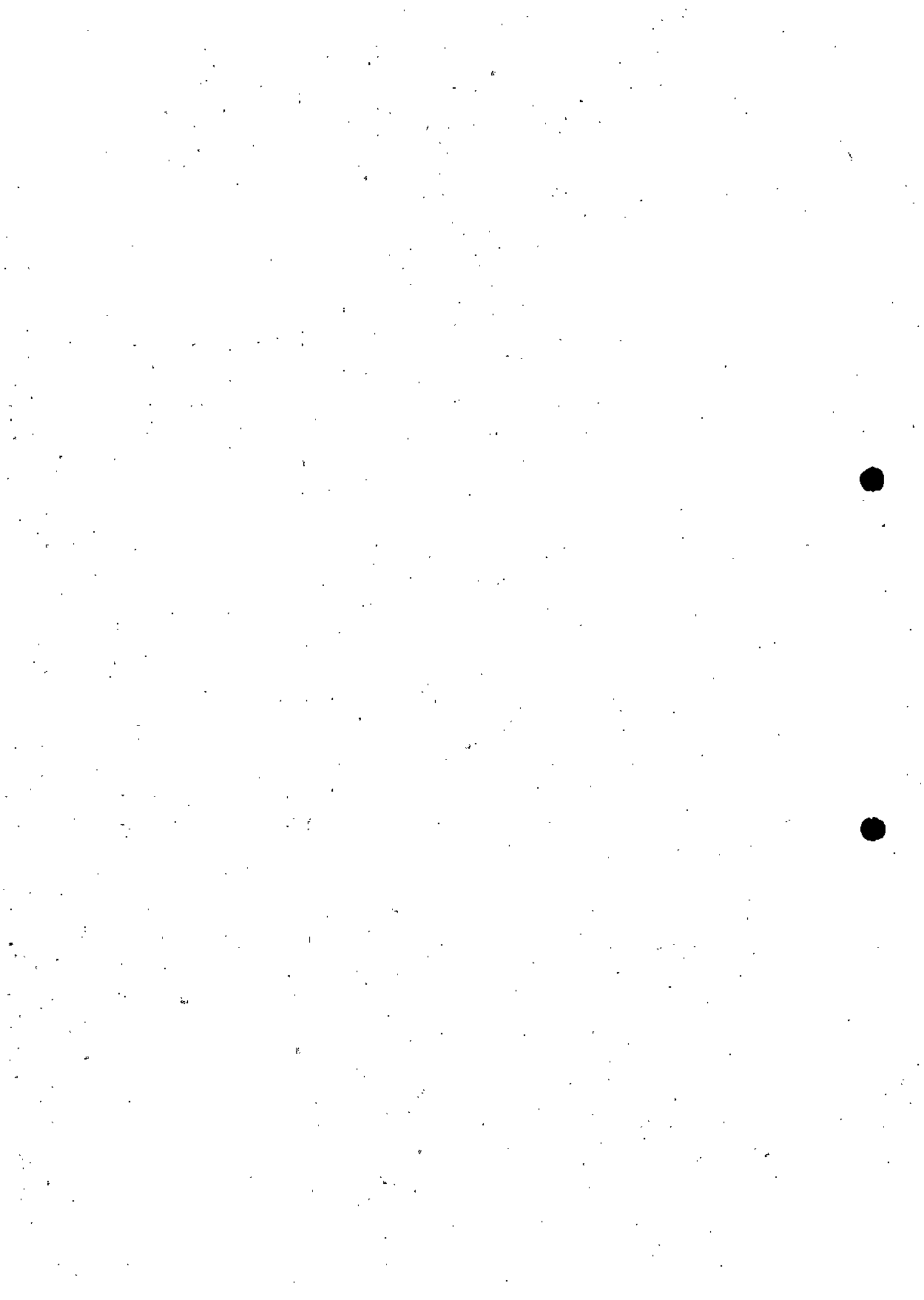
Quando acionada, a equipe do PMP irá até o local para avaliar a situação. Em caso de animal encontrado vivo, um médico-veterinário realiza os primeiros-socorros e orienta o procedimento de devolução do animal ao mar. Em caso de animal morto com até 3,0 m de comprimento, a carcaça deve ser transportada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

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

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

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

O estado de decomposição das carcaças pode limitar os tipos de amostras e de análises que podem ser obtidas. Portanto, as carcaças deverão ser classificadas

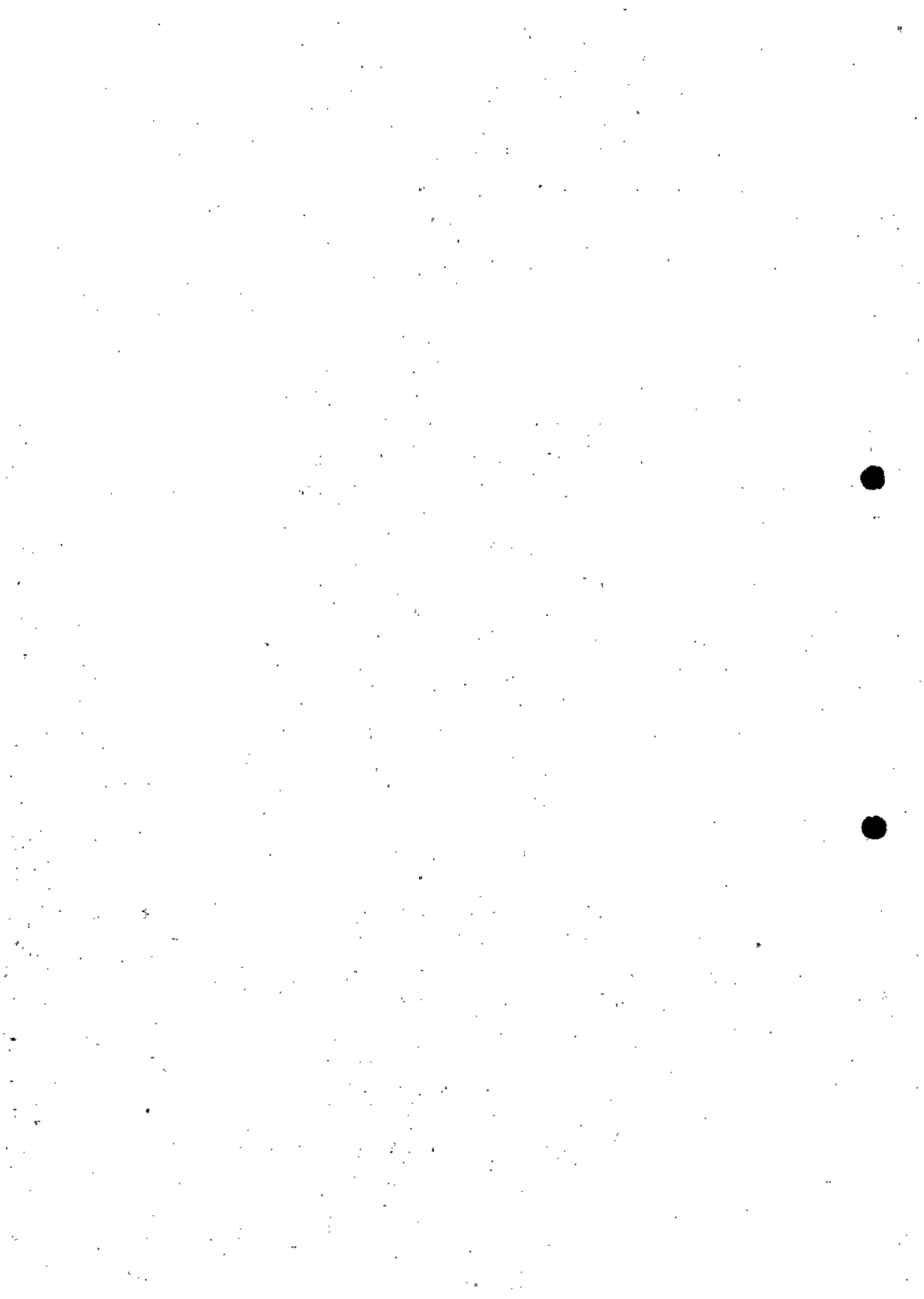


conforme Geraci & Lounsbury (2005) por meio de uma gradação em códigos de 1 a 5, sendo 1 o animal vivo e 5 os restos de esqueleto ou carcaça mumificada.

As amostras de tecidos de quelônios e cetáceos passarão por análises de microcontaminantes e metais. Para mercúrio total (HgT), amostras frescas de 0,4 g de músculo, 0,2 g de fígado e 0,2 g de rim deverão ser tratadas a frio com 1 mL de H₂O₂. Depois, são adicionados 5 mL de solução sulfonítrica concentrada (H₂SO₄-HNO₃; v/v) e as amostras aquecidas em banho-maria a 60°C por 2 h até sua completa solubilização. Os extratos são então resfriados por 15 minutos e 10 mL de KMnO₄ (5%) adicionados aos extratos. As amostras então retornam ao banho-maria pela mesma temperatura e tempo (60°C por 15 minutos) e são depois resfriadas em repouso por uma noite. No dia seguinte, o extrato é reduzido pela adição de 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (HONH₂) a 12%. Ao extrato final acrescenta-se água Milli-Q até completar 14 mL. As leituras serão realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio. A certificação do método de determinação do HgT é feita por materiais certificados DOLT-5 (fígado de peixe) e DORM-4 (músculo de peixe) do *National Research Council - Canadá* (NRCC). Todas as amostras deverão ser analisadas em duplicata e usados brancos analíticos em todas as baterias.

O Anexo 1 define que a determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cr, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) deve ser realizada através de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), por meio de um espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Para tal, uma solução de nitrato de paládio (Pd(NO₃)₂) é utilizada como modificador químico por adição a cada solução a ser analisada. Esta solução é preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS (Merck N° B9366989 710). O controle de qualidade é efetuado através do uso de materiais certificados de referência (DOLT-5 e DORM-4) do NRCC.

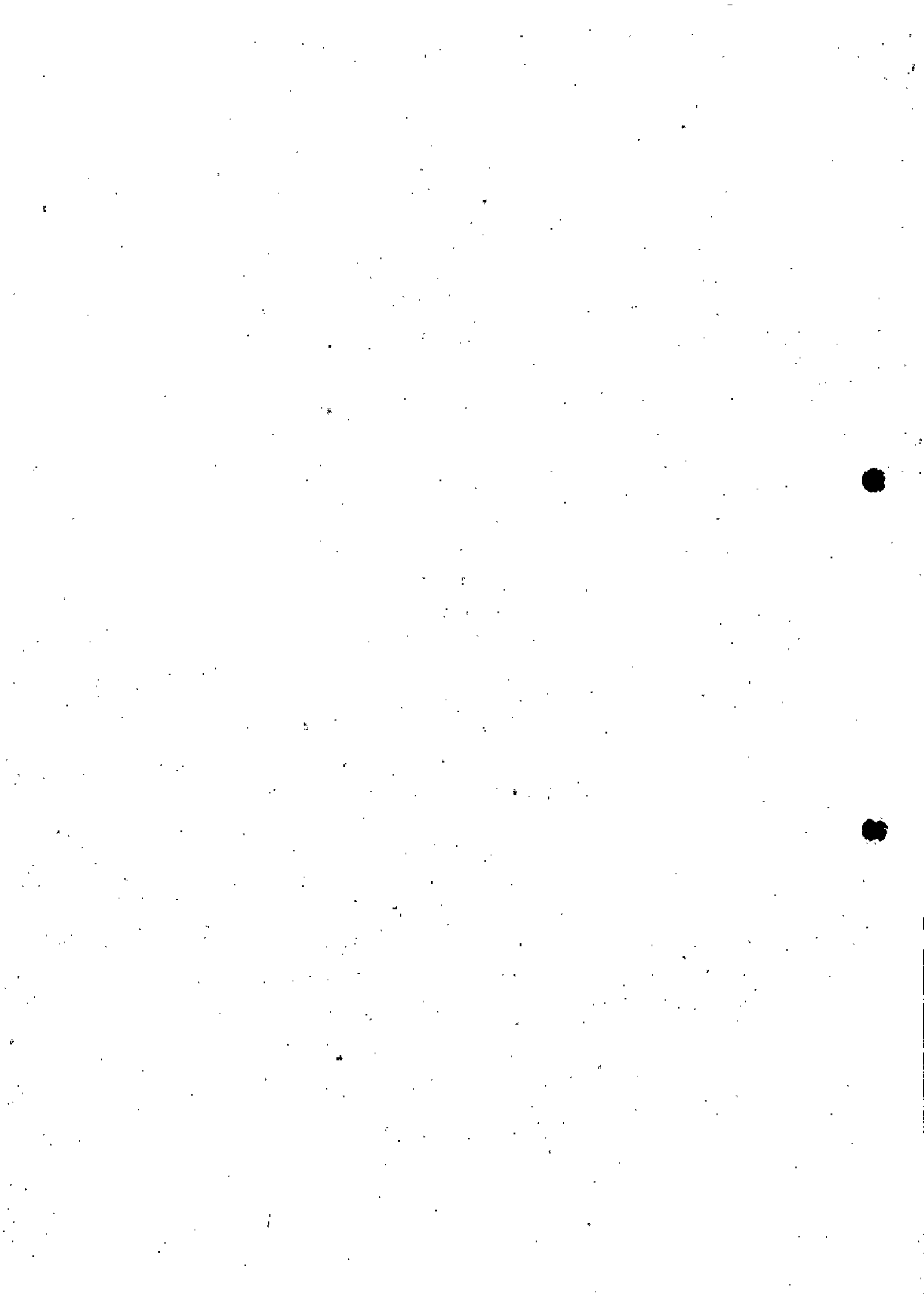
O Anexo 1 define que, para compostos organoclorados, as extrações são realizadas com aparelhos de *soxhlet* com capacidade para 60 mL e balões volumétricos de 125 mL, aquecidos individualmente por mantas. Será utilizada mistura de hexano e



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

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

Sugere-se rever a adoção de análises para detecção e mensuração de organoclorados e organobromados em amostras de quelônios e cetáceos. Sabe-se que estes compostos são há muitos anos usados na agricultura ou em processos de tratamento de água e madeira e não são encontrados na composição do rejeito

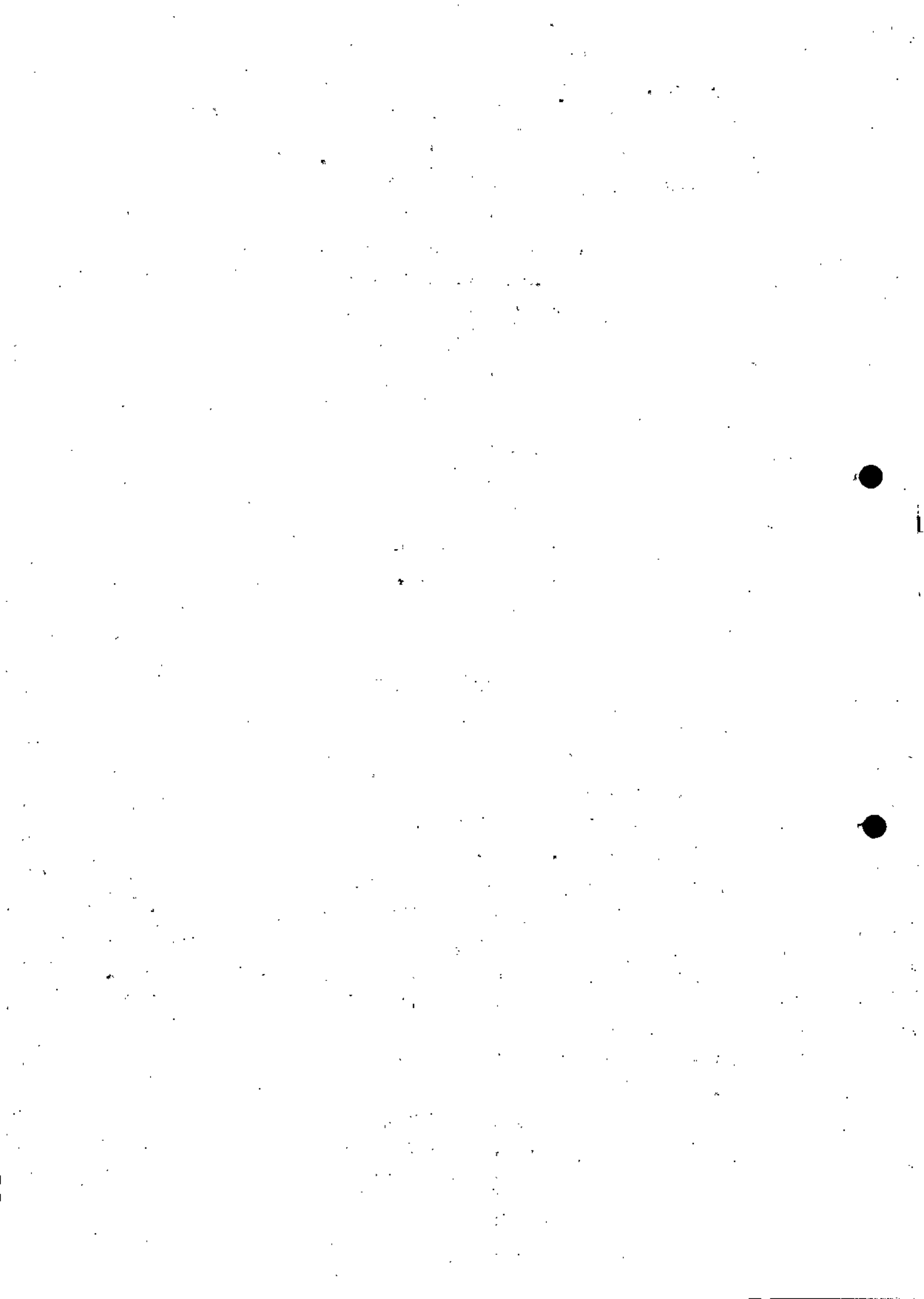


liberado pelo rompimento da barragem. Portanto, a presença destes compostos ou sua concentração nas amostras a serem obtidas não se relacionam diretamente com a pluma de rejeitos, mas são parte do processo histórico de uso do solo em toda a bacia do rio Doce e outras regiões do Brasil, onde o uso de defensivos sem o devido controle tem causado seu carreamento para os cursos hídricos há décadas.

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

- Amostras de sedimento

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



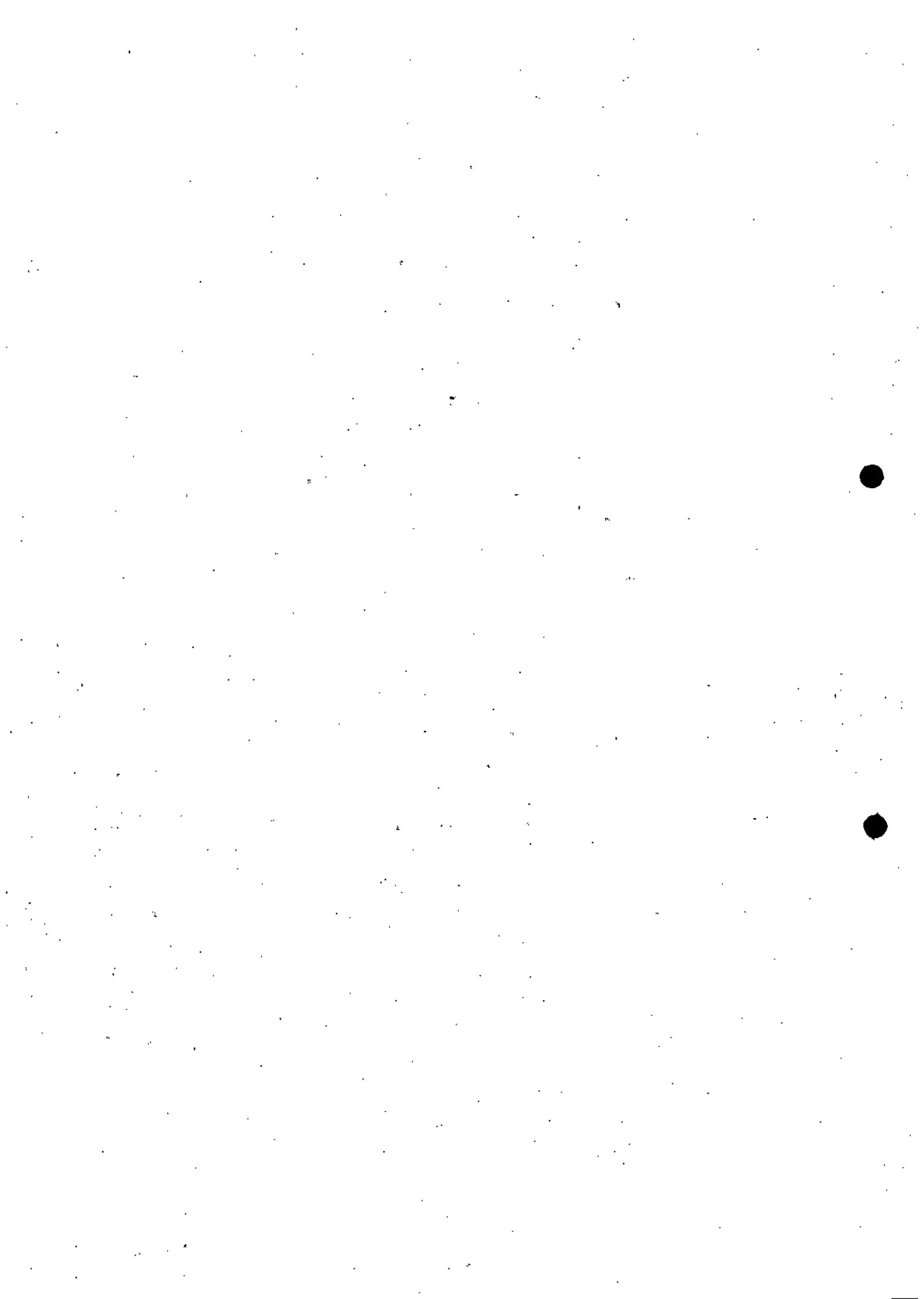
- Análises de parâmetros físico-químicos da água e modelagem ecotoxicológica

Amostras de água, medidas da temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido serão coletadas com uma sonda multiparâmetros no momento da coleta. A concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) será determinada em amostras de água filtradas em malha de 0,45 µm, por meio de um analisador de carbono total (TOC). A concentração de sulfatos será determinada por método turbidimétrico com leitura em espectrofotômetro a 420 nm (TABATABAI, 1974). A alcalinidade total é mensurada por titulação com solução padrão ácida, utilizando-se método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (Ca, K, Mg e Na) é determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. A concentração de cloretos é analisada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Com base nos resultados obtidos para as amostras de água doce, será realizada a modelagem ecotoxicológica dos dados com fins à previsão da biodisponibilidade e toxicidade de metais nos diferentes ambientes dulcícolas, por meio do Modelo do Ligante Biótico (BLM) versão 2.2.3.

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

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

Para as análises de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn, as amostras de água filtradas e não filtradas oriundas dos pontos de amostragem da foz do rio Doce e região costeira adjacente serão dessalinizadas para minimizar um possível "efeito matriz" associado

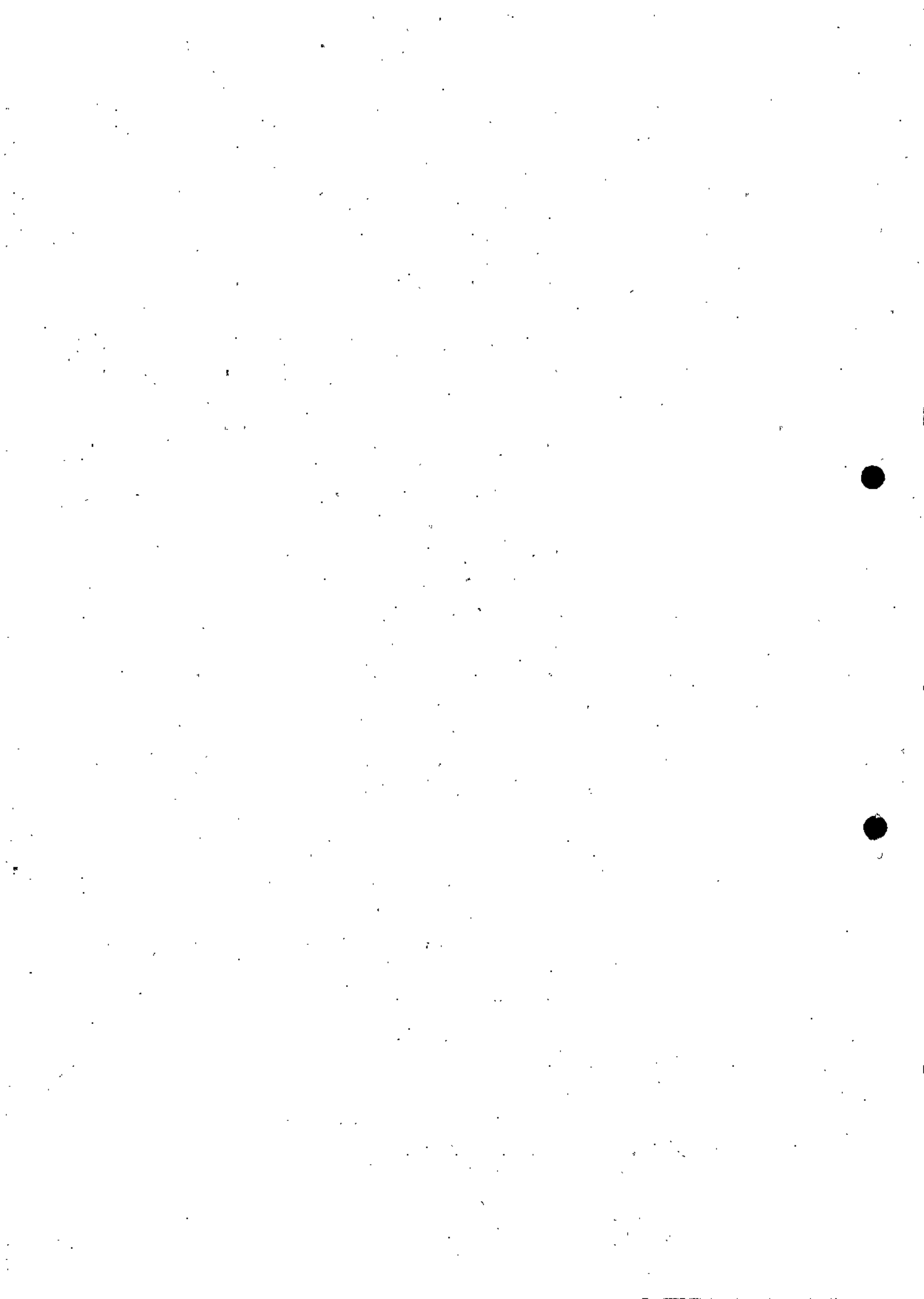


às altas concentrações de íons típicas da água salgada (NADELLA *et al.*, 2009). Isso é feito pela precipitação dos metais representativos presentes em 1 mL de amostra de água após adição de 1 µL de óxido de lantânio (10 mg La/mL) e 7,5 µL de carbonato de sódio (1 M), aumentando o pH para 9,8. A solução é depois gentilmente agitada em banho-maria a 80°C por 30 minutos flocular o precipitado, majoritariamente formado por hidróxido de lantânio. A solução resultante é centrifugada a 3.000 xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante obtido descartado. O precipitado remanescente é dissolvido em 1 mL de Suprapur® e utilizado na determinação da concentração de metais.

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

As amostras de material biológico são previamente secas em estufa (45-60°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 *Eppendorfs* 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 dos metais nas amostras àquelas presentes nas soluções padrões certificadas para calibração do equipamento.

As concentrações dos metais no material biológico serão apresentadas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e µg/g de peso seco (mg/kg de peso seco). Os resultados das amostras de músculo de crustáceos e peixes serão comparados com os limites 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 serão apresentadas em $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e $\mu\text{g/g}$ de peso seco (mg/kg de peso seco). Além do uso de "brancos" para aferir a acurácia e exatidão das análises, será utilizado material de referência do NRCC (MESS-4). Amostras de sedimento serão tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras coletadas neste monitoramento, conforme descrito anteriormente.

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

- Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes

Concentração de metalotioneínas

A concentração de metalotioneínas será determinada segundo Viarengo *et al.* (1997). O material biológico é homogeneizado e centrifugado a 6.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o precipitado homogeneizado com 1 mL de etanol a 87% e clorofórmio a 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM). A solução resultante é centrifugada a 6.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante é novamente descartado e o novo precipitado homogeneizado em 150 μL de NaCl (250 mM). Posteriormente são adicionados 150 μL de solução de EDTA (4 mM) e HCl (1 N). A seguir, 100 μL de cada amostra (em duplicata) deverão ser adicionadas a 1,4 mL de solução de DTNB preparada em um tampão (pH 8,0) contendo $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200 mM), NaCl (2 M) e DTNB (0,43 mM). Após nova centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos, 350 μL do



sobrenadante de cada amostra é transferido, em duplicata, para as poças de uma microplaca. A leitura de absorbância é feita em espectrofotômetro de microplacas a 405 nm. Os resultados serão apresentados em $\mu\text{mol GSH/g}$ 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 MilliQ por 30 s, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa a 70°C, é determinado o peso seco do material e este digerido em Suprapur®. As amostras são diluídas para análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama, após digestão completa. A concentração de cloretos será determinada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre, sendo os resultados apresentados em mg/g de peso úmido.

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

Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

Para a determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, as amostras biológicas serão preparadas conforme Péqueux & Chapelle (1982). As amostras são homogeneizadas em meio com 1 mL de tampão SI (Sacarose - Imidazol em pH 7,6) e mantidas em banho de gelo. Depois serão centrifugadas a 5.000 rpm e a 5°C por 5 minutos. São recolhidos 100 μL do sobrenadante e adicionados 2,5 mL de uma solução salina A com 77 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 6 mM de MgCl₂ e 3 mM de ATP. O pH da solução é ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras são incubadas no escuro por 60 minutos a 25°C e feita a leitura a 620 nm. A mesma reação é feita com 100 μL de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina B com 83 mM de NaCl, 6 mM de MgCl₂, 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína.

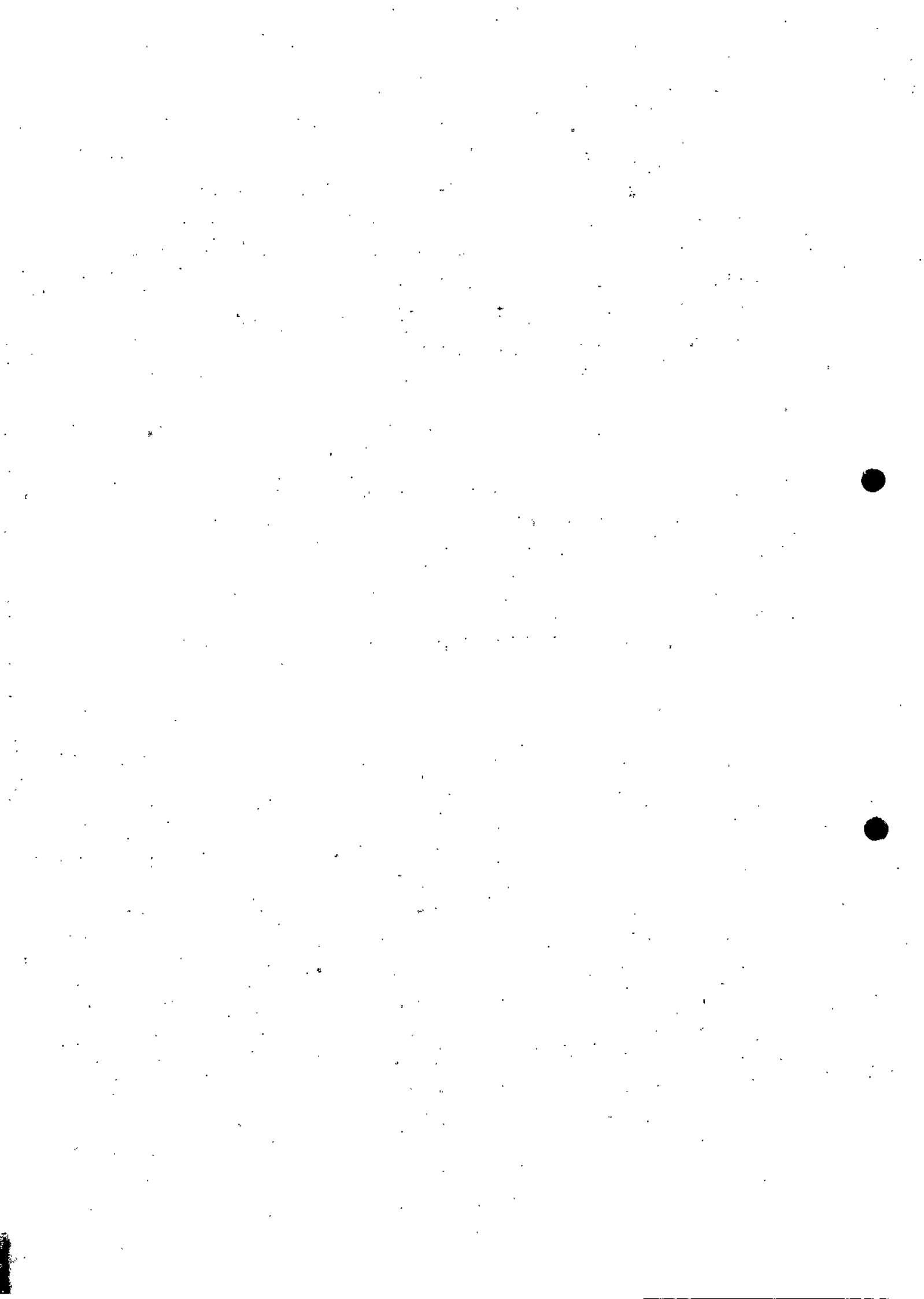


As duas reações são mantidas por 1 h e depois inibidas pela adição de ácido tricloroacético a 50%. A quantidade de fósforo produzido em cada reação é determinada por um kit de reagentes específicos. A diferença na quantidade de fósforo entre as duas reações é considerada como aquela atribuída à atividade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

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 (Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-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 CO₂ 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 μL do homogeneizado são adicionados a 3 mL de uma solução de reação feita de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). São adicionados 280 μL de substrato (água destilada saturada com CO₂) e o pH registrado a cada 5 s durante 30 s por um pHmetro de bancada. Ao mesmo tempo são feitas determinações do "branco de reação", quando 15 μL do tampão de homogeneização são acrescentados à solução de reação e ao substrato. Será utilizado o modelo de regressão linear, sendo o pH a variável dependente e o tempo a variável independente, para definir a declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos a partir dos homogeneizados é a taxa de reação catalisada, enquanto



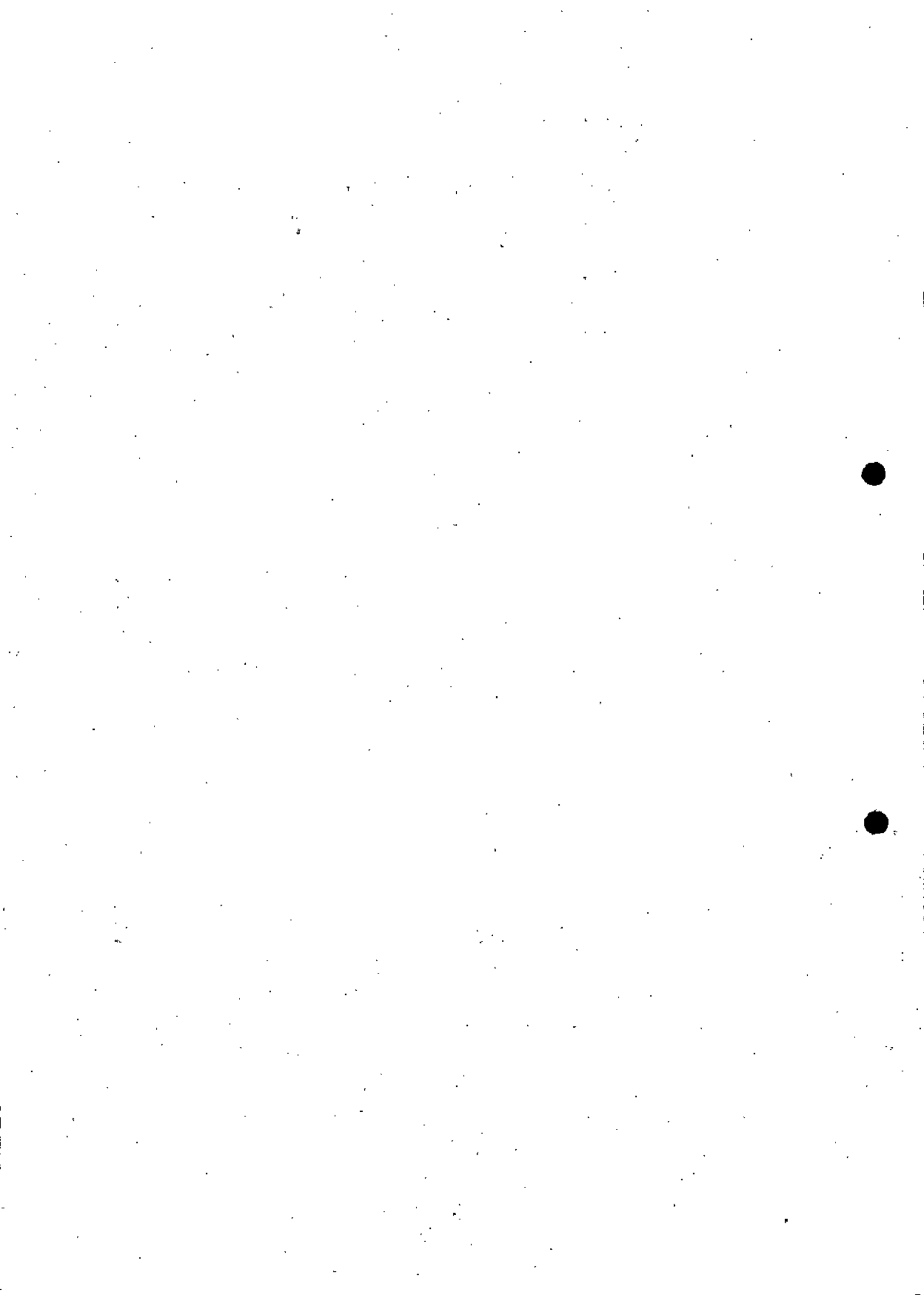
a média dos dados obtidos nos brancos é a taxa da reação não catalisada. Os resultados são normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e apresentados em unidades de anidrase carbônica/mg de proteína.

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

O meio de reação para análise da atividade da Mg_2^+ -ATPase é formado por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), EGTA (0,2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação desta reação também é feita a 30°C por 30 minutos. ATP (3 mM) e ouabaina (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 μM) 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), MgCl_2 (20 mM), NADH (150 μM) e tampão Tris-HCl (50



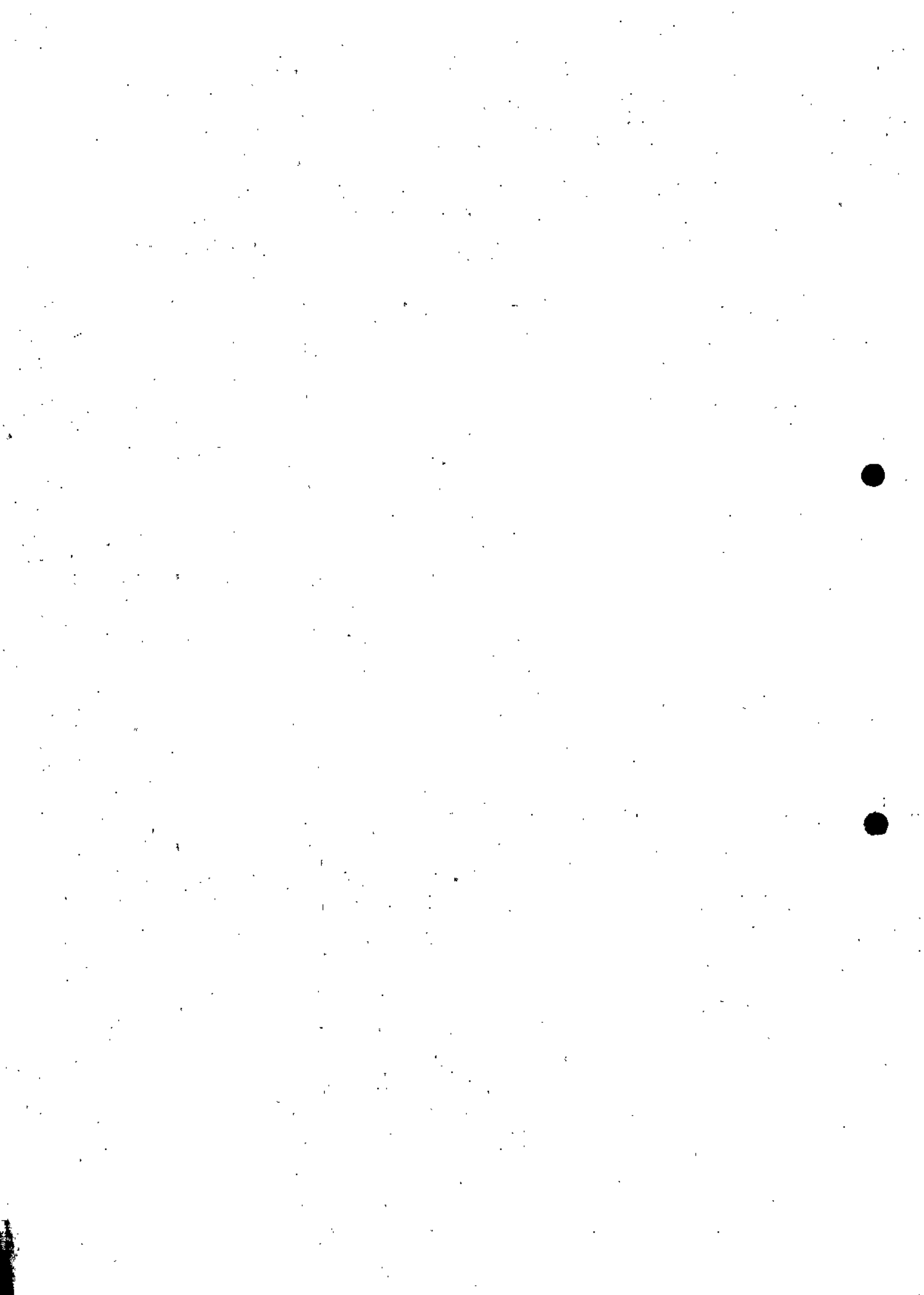
mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas seguem Thuensen *et al.* (2005) e Childress & Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, adaptadas por Ribeiro *et al.* (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas em análise é determinada por espectrofotometria 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°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.

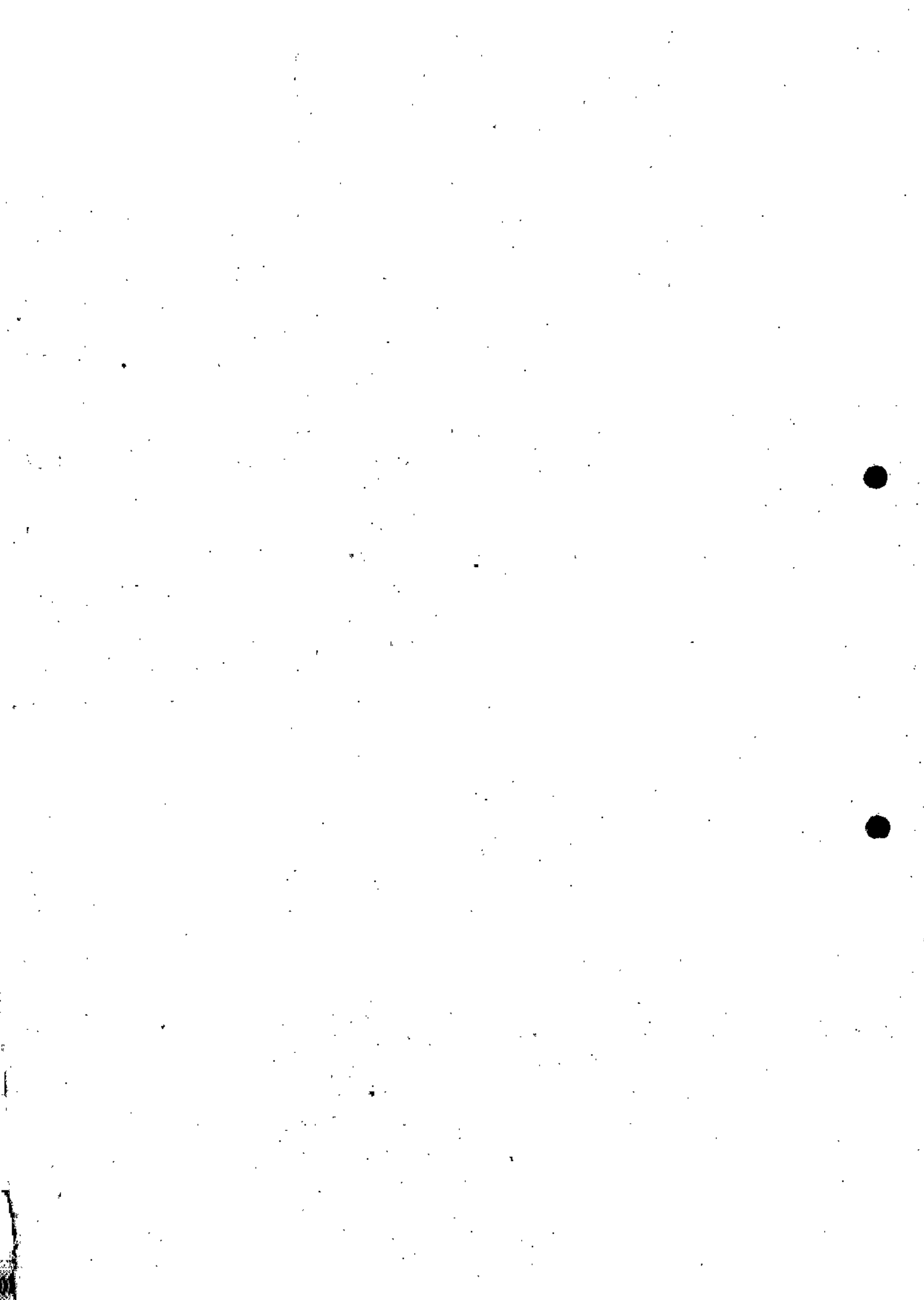


Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas serão analisados segundo Dalle-Done (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



deteção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (PromoKine, Promocell®). Os resultados são apresentados em sítios AP/mg de proteína, considerando a concentração de proteínas nas amostras, determinada pelo método de Bradford.

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

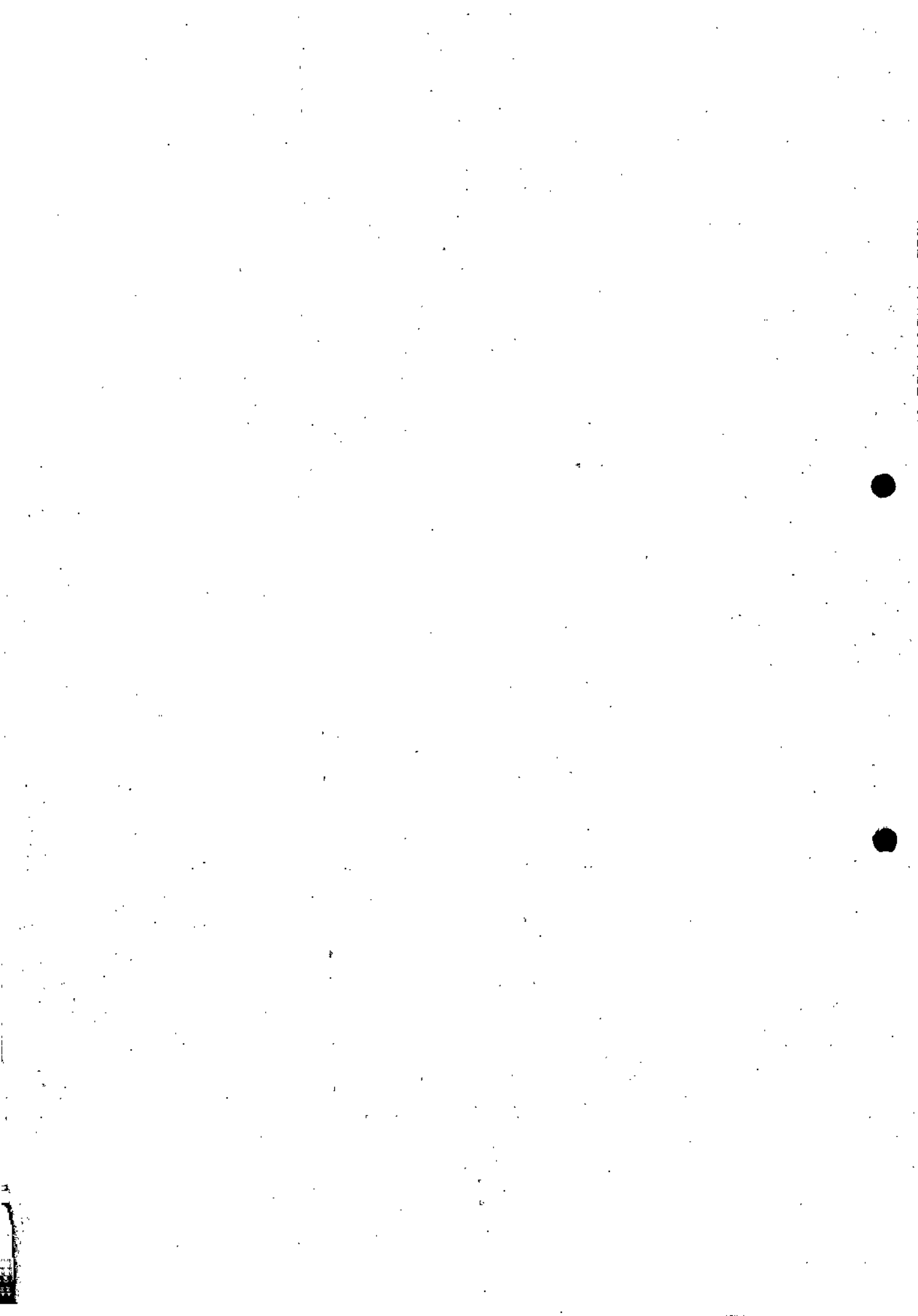
O ensaio do vermelho neutro é feito com os hemócitos das amostras de hemolinfa de camarões e caranguejos das diferentes áreas do monitoramento. As lâminas para microscopia (76 x 26 mm) são lavadas antes da coleta (primeira lavagem com água e detergente neutro a 5%; segunda lavagem com água corrente; terceira lavagem com solução de água destilada saturada com HCl; quarta lavagem com água destilada em abundância). As lâminas são depois secas e uma de suas faces tratadas com solução de poly-L-lisina em água destilada (1:10) para a adesão dos hemócitos vivos na superfície. Isto é feito pingando-se 10 µL dessa solução com uma micropipeta monocal canal sobre uma das laterais da lâmina, fazendo esfregaço com lâmina e posterior disposição ao ar para secagem. A diluição da hemolinfa dos crustáceos é feita com solução fisiológica específica para a espécie-alvo. A solução estoque de vermelho neutro consiste da dissolução de 0,0228 g deste corante em 1 mL de DMSO (dimetil-sulfóxido), com posterior preparo da solução de trabalho de vermelho neutro (10 µL da solução estoque + 5 mL de solução fisiológica) homogeneizada com agitador magnético por 1 a 2 minutos. Também deverá ser preparada uma solução anticoagulante, formada por 2,05 g glicose, 0,8 g de citrato de sódio e 0,42 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada, diluída com solução fisiológica na proporção 2:1 (0,334 mL de solução anticoagulante e 0,166 mL da solução fisiológica). Aspira-se 0,7 mL desta solução anticoagulante com uma seringa hipodérmica (1 mL) e agulha 21 gauge (que impede a destruição dos hemócitos e a formação de coágulos). À solução são adicionados 0,3 mL de hemolinfa do crustáceo, colhida na membrana de articulação carpo-propodal do quelípodo maior. O conteúdo é transferido para tubo siliconado (2 mL) e mantido em descanso por 15 minutos para minimizar a força de adesão, evitando o rompimento dos hemócitos e a coagulação. Quarenta µL 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 μL da solução de trabalho de vermelho neutro são pipetados sobre cada lâmina, homogeneizado aos 40 μL 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%.

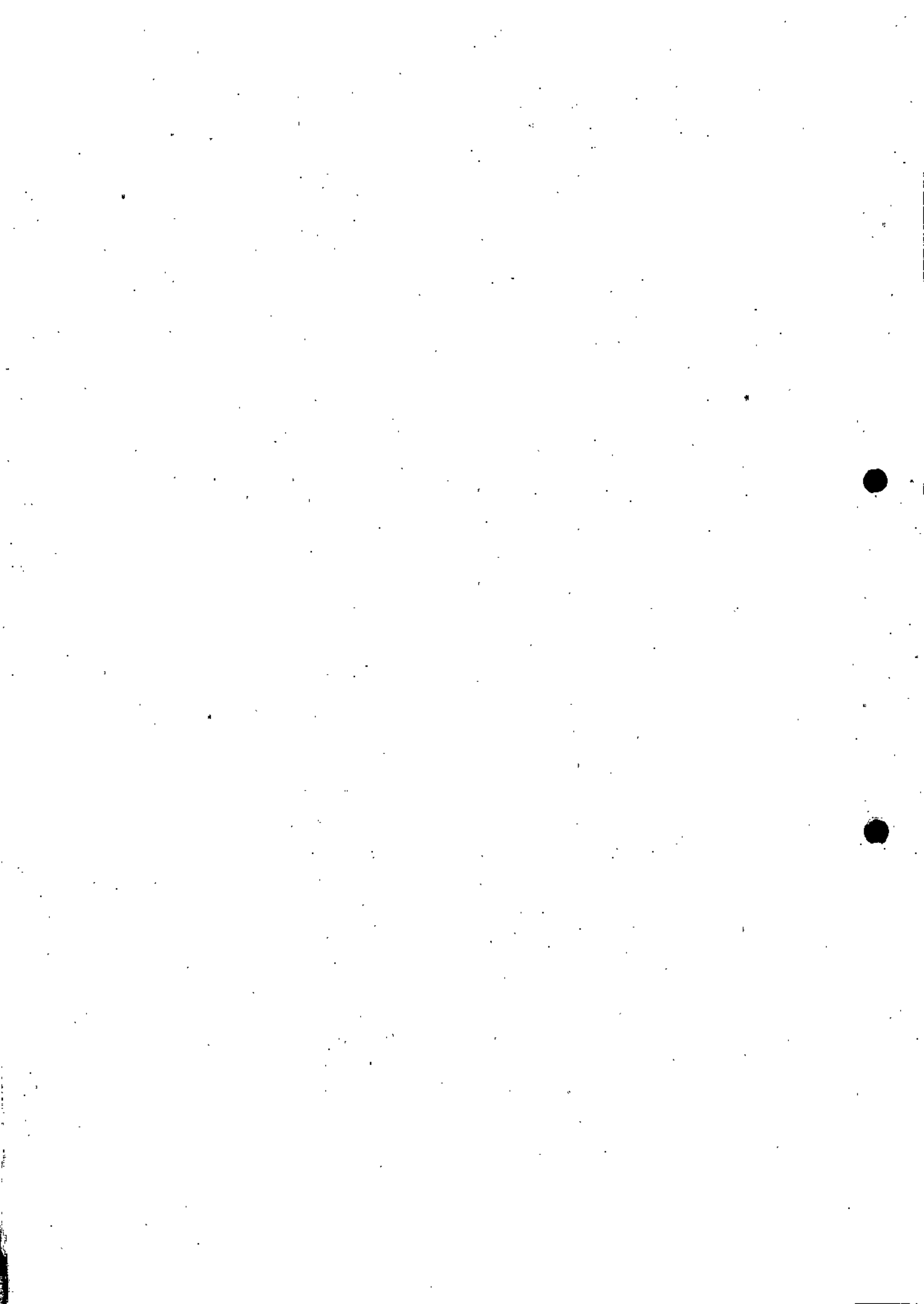
A avaliação do dano no material genético também pode ser feita por ensaio de micronúcleo, sendo utilizadas amostras de hemolinfa e sangue. Após coleta das amostras com seringas (1 mL e agulhas 21 gauge), estas são transferidas para tubos siliconados. Os tubos são microcentrifugados a 1.000 rpm por 5 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. Aliquotas 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 Na₂HPO₄ e 1,7 mM K₂HPO₄) 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 alcali-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:

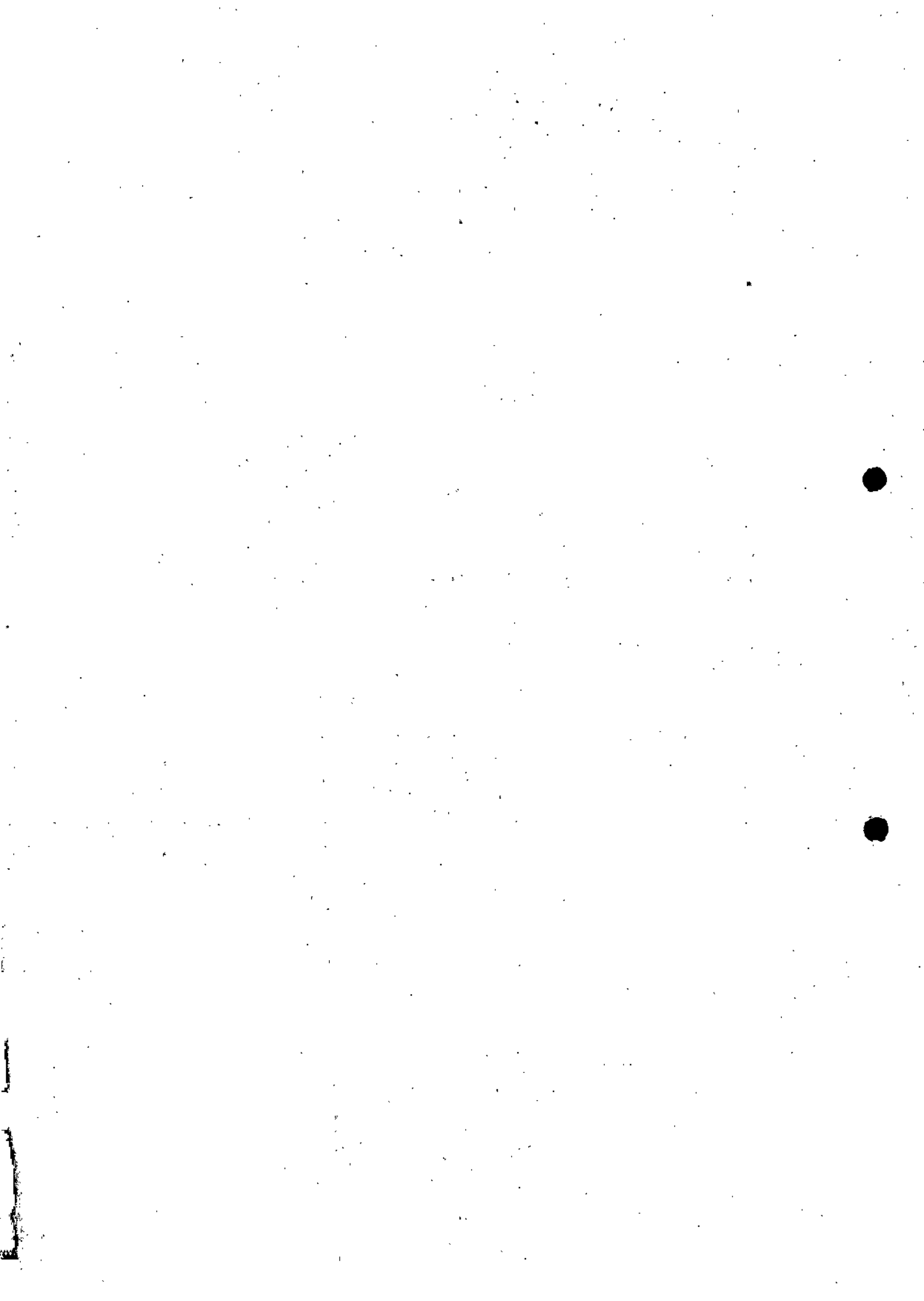
$$PR = MP/MC \times 100$$

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



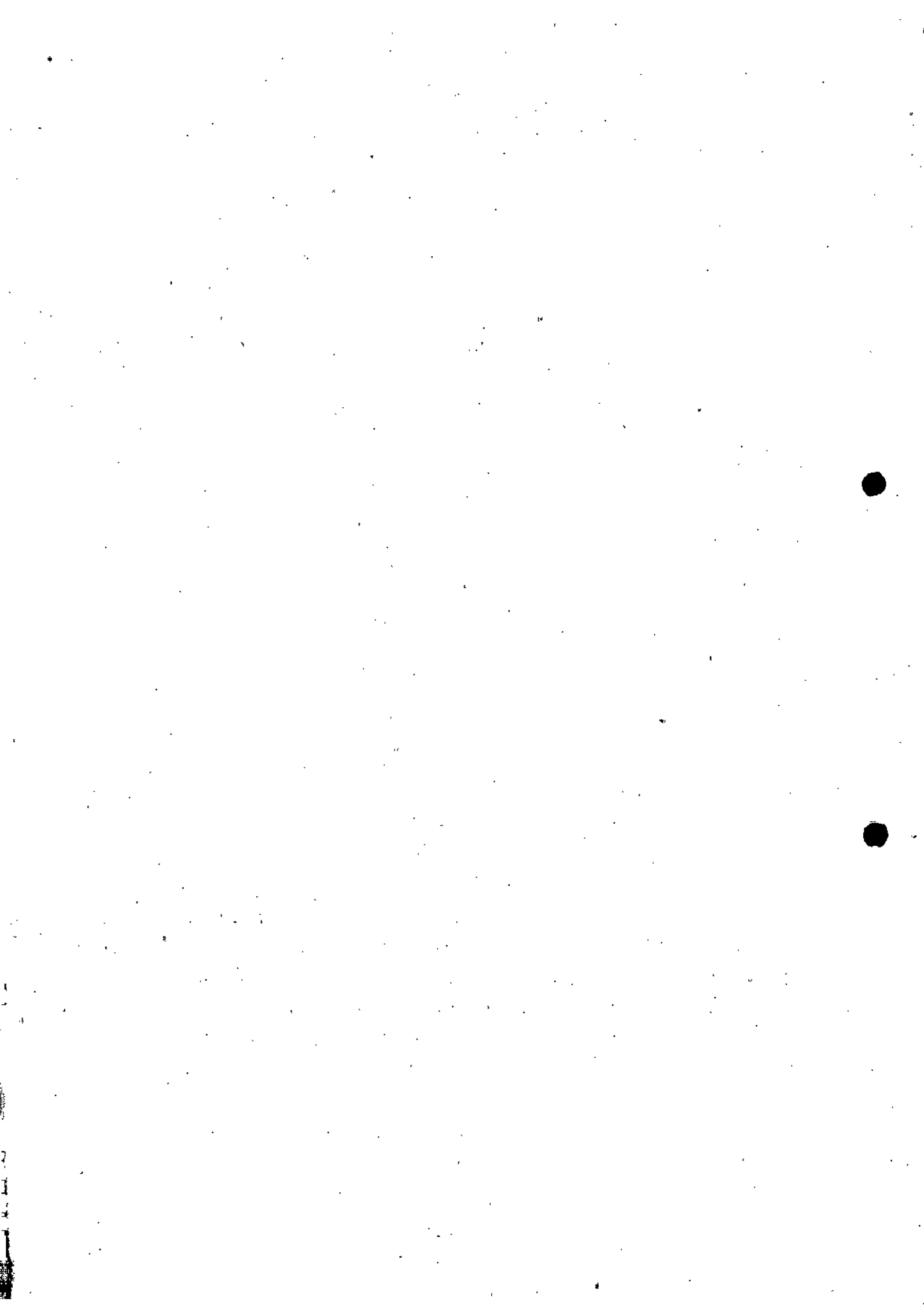
submetidas à técnica de coloração PAS, cuja preparação inclui banho em ácido periódico a 1% por 10 minutos, lavagem em água destilada e imersão em Reativo de Schiff por 20 minutos. Em seguida, as lâminas são novamente lavadas em água corrente por 10 minutos, coradas com hematoxilina de Harris por 3 minutos, 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.

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

Este anexo visa implementar um programa de monitoramento na Área Ambiental 1 com coleta e análise de parâmetros sedimentológicos e geoquímicos (granulometria, mineralogia, metais, isótopos, nutrientes e orgânicos) em associação com parâmetros biológicos (composição, estrutura e dinâmica das comunidades planctônicas a partir de coletas periódicas). Este monitoramento será realizado em paralelo com a instalação de um sistema de boias e linhas de fundeio na plataforma e na foz do rio para determinação da vazão e descarga sólida, distribuídas quanto à profundidade e distância da foz para que sejam medidos parâmetros de forçantes oceanográficas (correntes, ondas e estrutura da coluna d'água), material particulado em suspensão, química de material dissolvido, tamanho do material particulado em suspensão, temperatura e salinidade da água, fluorescência, etc.



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

O estudo proposto prevê a utilização das boias oceânicas, estação meteorológica, marégrafo e estação hidrossedimentológica por cinco anos, com o objetivo de construção de um modelo hidrodinâmico. Um modelo preliminar pode ser alcançado com dados históricos já disponíveis e validados, o que confere maior segurança às análises. Estão disponíveis dados da estação meteorológica de Linhares, a cerca de 30 km da foz do rio Doce, mapas batimétricos, estimativas de vazão dos rios, tábuas de marés, padrões de comportamento dos ventos e outros. Sugere-se a elaboração de um modelo preliminar com base nestas informações, complementado por até cinco boias instaladas em áreas de pouca resolução para refinamento dos dados, com funcionamento inicial de 18 meses. O modelo passaria por validação após 12 e 18 meses e seria então utilizado para subsidiar análises de impacto e abordagens de recuperação.

O monitoramento e estudo da dinâmica da pluma serão acompanhados da validação e calibração de imagens de satélite, visando uma análise espacial da distribuição geográfica da pluma e de parâmetros como MPS, clorofila e temperatura.

3.3.1 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.

3.4.2 Área de Estudo

O monitoramento se dará ao longo de toda Área Ambiental 1, sendo os pontos de amostragem os mesmos do Anexo 1 do TR4, à exceção dos 22 pontos de ambientes dulcícolas localizados na bacia do rio Doce. Portanto, os pontos são aqueles



especificados nos Quadros 1, 2 e 3 deste Plano de Trabalho, com adições de pontos na APA Costa das Algas, na foz do rio Doce, Barra Nova e Abrolhos (Quadro 5).

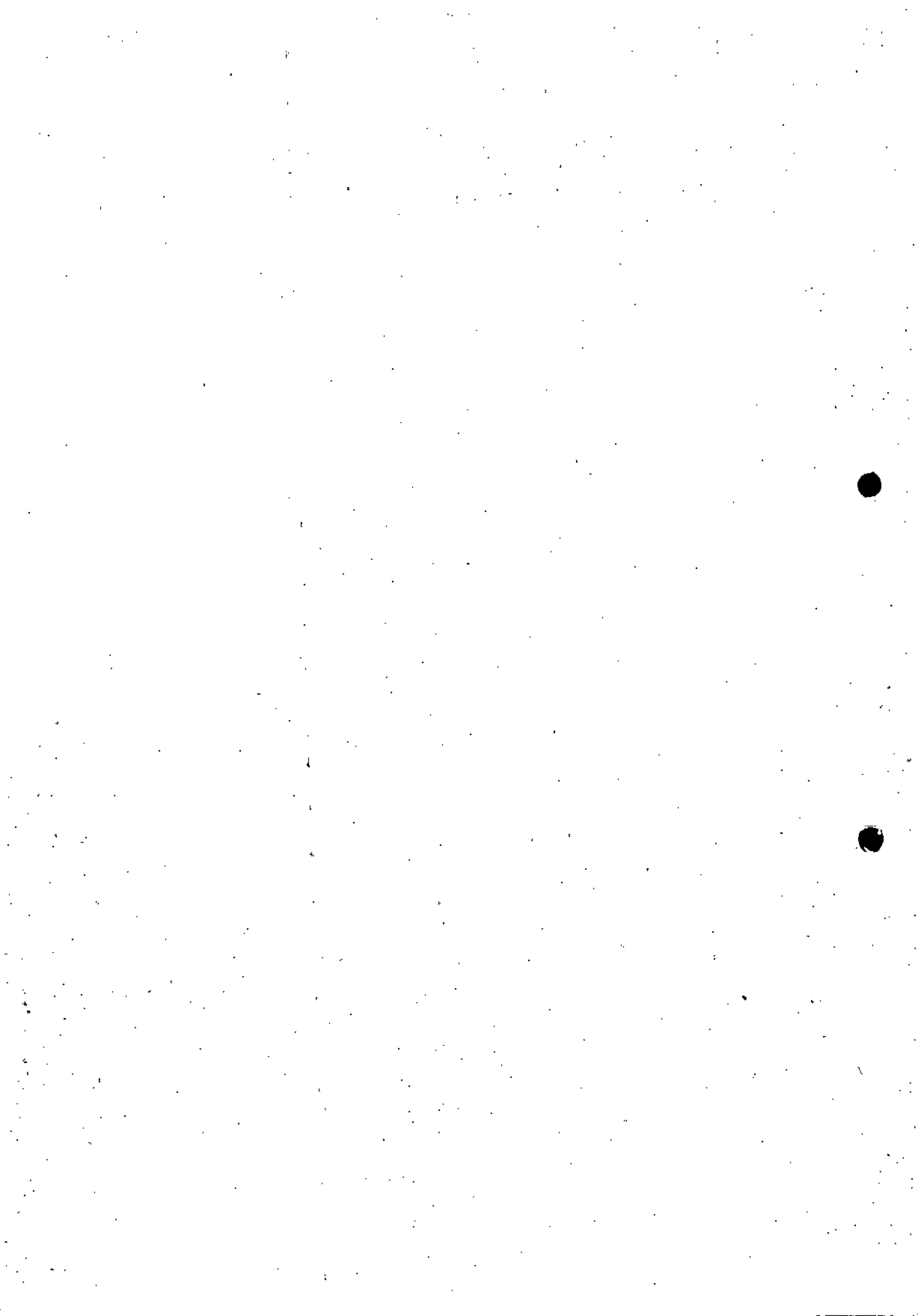
Quadro 5 - Pontos de amostragem adicionados aos definidos no Anexo 1 para os estudos do Anexo 3.

Localidade	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Costa das Algas	390337,47	7791253,33
	418100,29	7795785,50
	411733,24	7771576,83
	384717,37	7796897,30
	380039,35	7787946,29
	377312,30	7783943,25
Foz do rio Doce	423532,19	7829898,27
	419392,04	7823040,29
	428467,28	7815169,60
	411878,67	7816813,49
	437864,09	7807959,95
Barra Nova	426146,95	7903599,21
	454268,01	7903337,90
Abrolhos	530164,59	8011813,77
	517176,55	8007563,71

Fonte: Anexo 3, TR4.

Os pontos no rio Doce serão alvo de investigação após publicação do Anexo 2 revisado, de forma a se garantir que as análises de água e sedimentos coincidam com os locais de coleta dos organismos dulcícolas, permitindo correlações entre os resultados dos diferentes monitoramentos. Contudo, caso seja julgado procedente a manutenção dos pontos de amostragem do atual Anexo 2 para as coletas e análises previstas no Anexo 3, a Fundação Renova irá conduzir os estudos naquela malha de amostragem conforme os métodos e premissas aqui apresentados.

Para a amostragem de macroalgas, rodólitos e estruturas recifais é definida malha de pontos específica devido à distribuição destes organismos e características dos estudos (Quadro 6).



Quadro 6 - Pontos de amostragem específicos para macroalgas, rodolitos e fundos recifais.

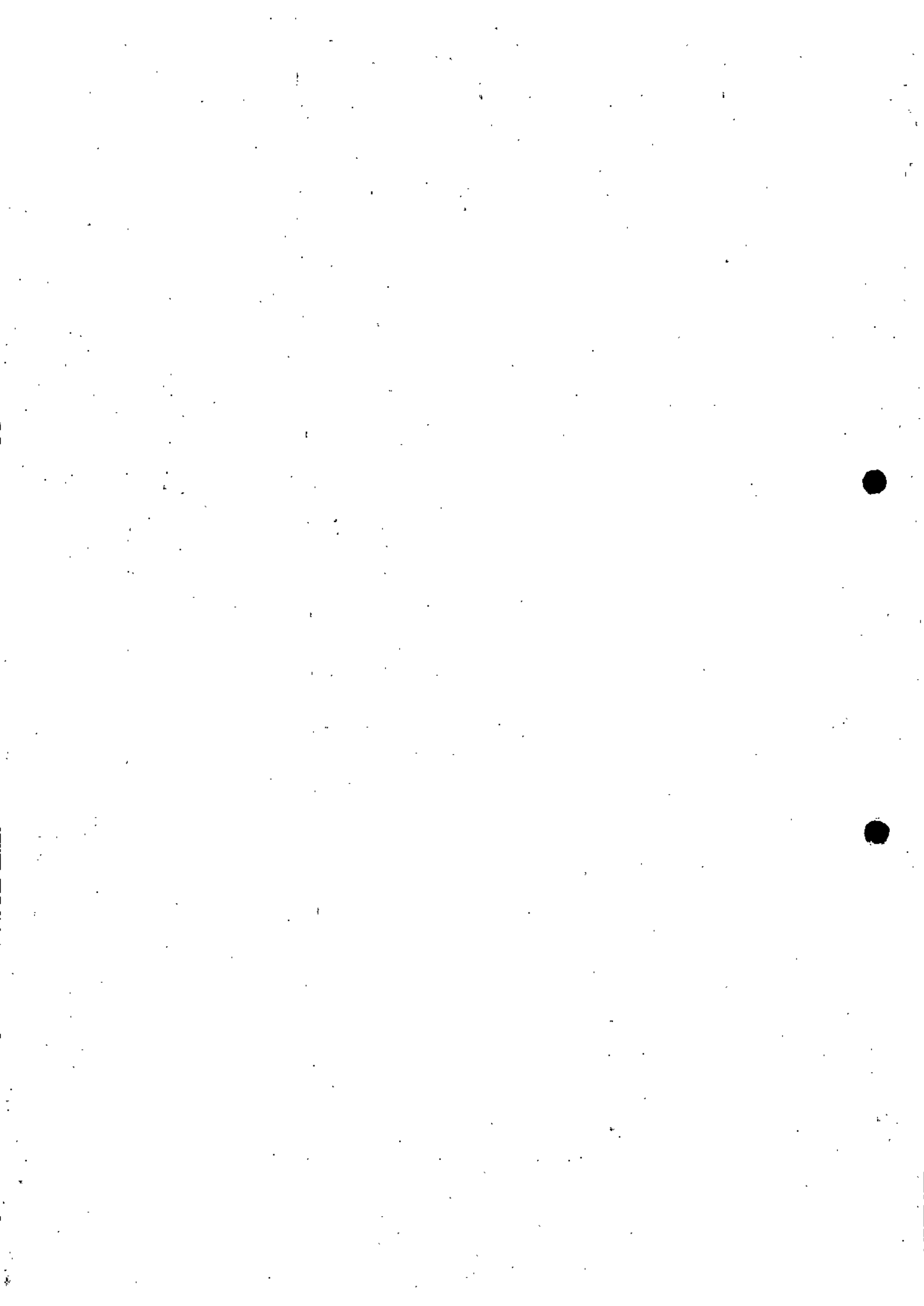
Localidade	Tipo de estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
Costa das Algas	Macroalgas e rodolitos	385772,33	7799135,25
		384717,37 *	7796897,30 *
		383145,36	7795789,31
RVS Santa Cruz		381051,27	7791249,30
		380039,35 *	7787946,29 *
Costa das Algas		378873,34	7784750,27
		377312,30 *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

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

3.4.3 Metodologias e Periodicidade

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

Mensal: realizada em 26 pontos na bacia e foz do Rio Doce para caracterização da variabilidade interanual do sistema dulcícola-costeiro-marinho. Nestas estações deverão ser medidos os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), biomassa de plâncton (fito e zooplâncton), perífiton e sedimento de fundo (química e



sedimentologia). Destaca-se novamente que a revisão do Anexo 2 pode alterar esta malha para ambientes dulcícolas.

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

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

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

Medições contínuas: fundeios em cinco pontos na Plataforma Continental, sendo três na foz, um na APA e um em Degredo, visando medições de parâmetros físicos, como ondas e correntes, e sensores de turbidez, temperatura, salinidade e fluorescência ao longo da coluna d'água. São previstas linhas com boias e transmissão online por rádio ou satélite. A posição dos pontos de fundeio é mostrada no Quadro 7.

Quadro 7 - Pontos de fundeio fixo propostos no Anexo 3 do TR4.

	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
Fundeio Fixo	389033,75	7787283,83
	411157,67	7819785,23
	423101,16	7832156,86



	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	x	y
	429169,14	7815643,41
	432982,28	7865272,45

Fonte: Anexo 3, TR4.

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

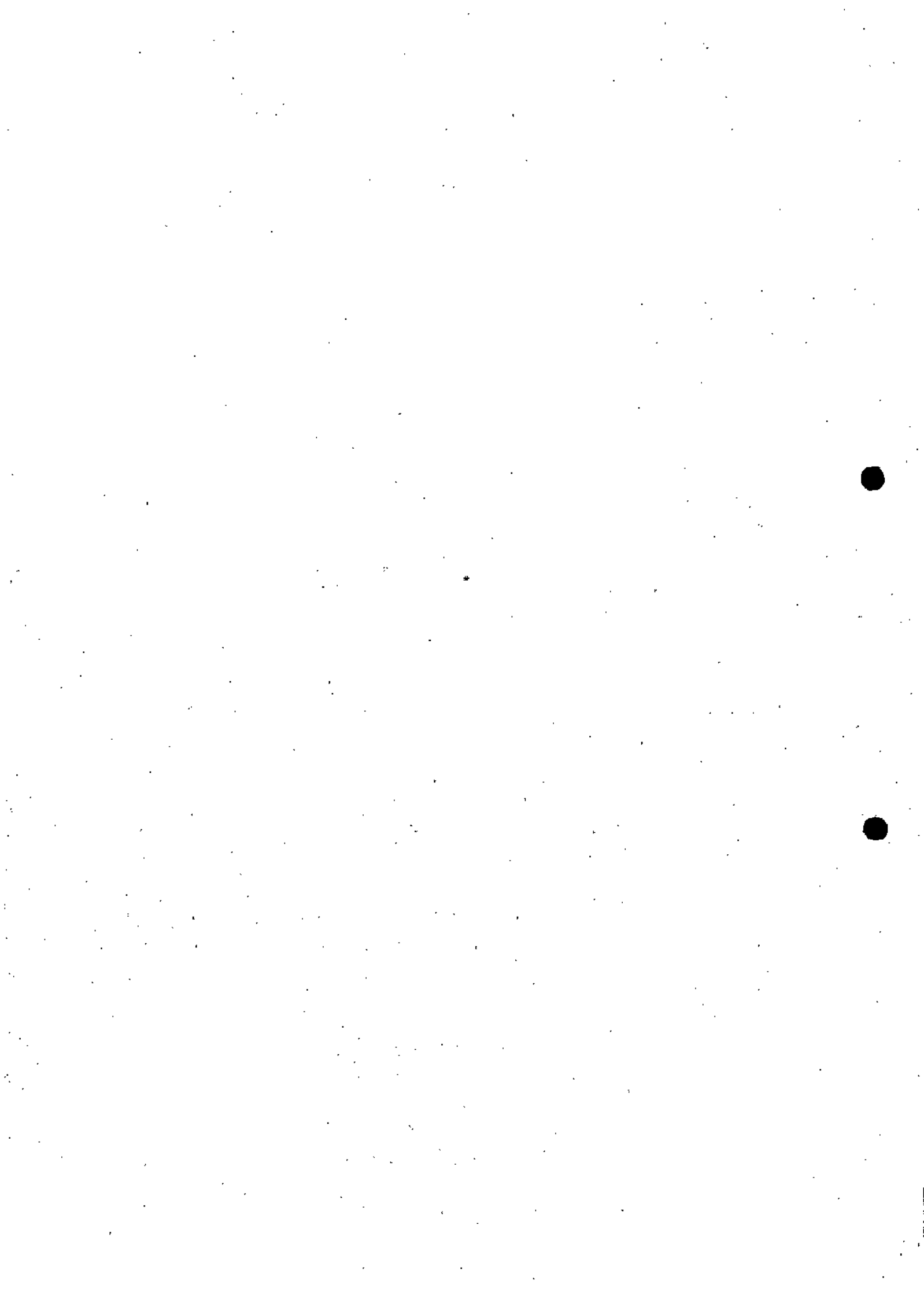
Modelagem Numérica

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

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

- Parâmetros físico-químicos da água *in situ*

Em cada ponto de monitoramento será realizada perfilagem contínua da coluna d'água com CTD. A coleta de dados *in situ* será feita de duas formas: coletas de dados de temperatura, salinidade e pressão, além de água em profundidades pré-definidas

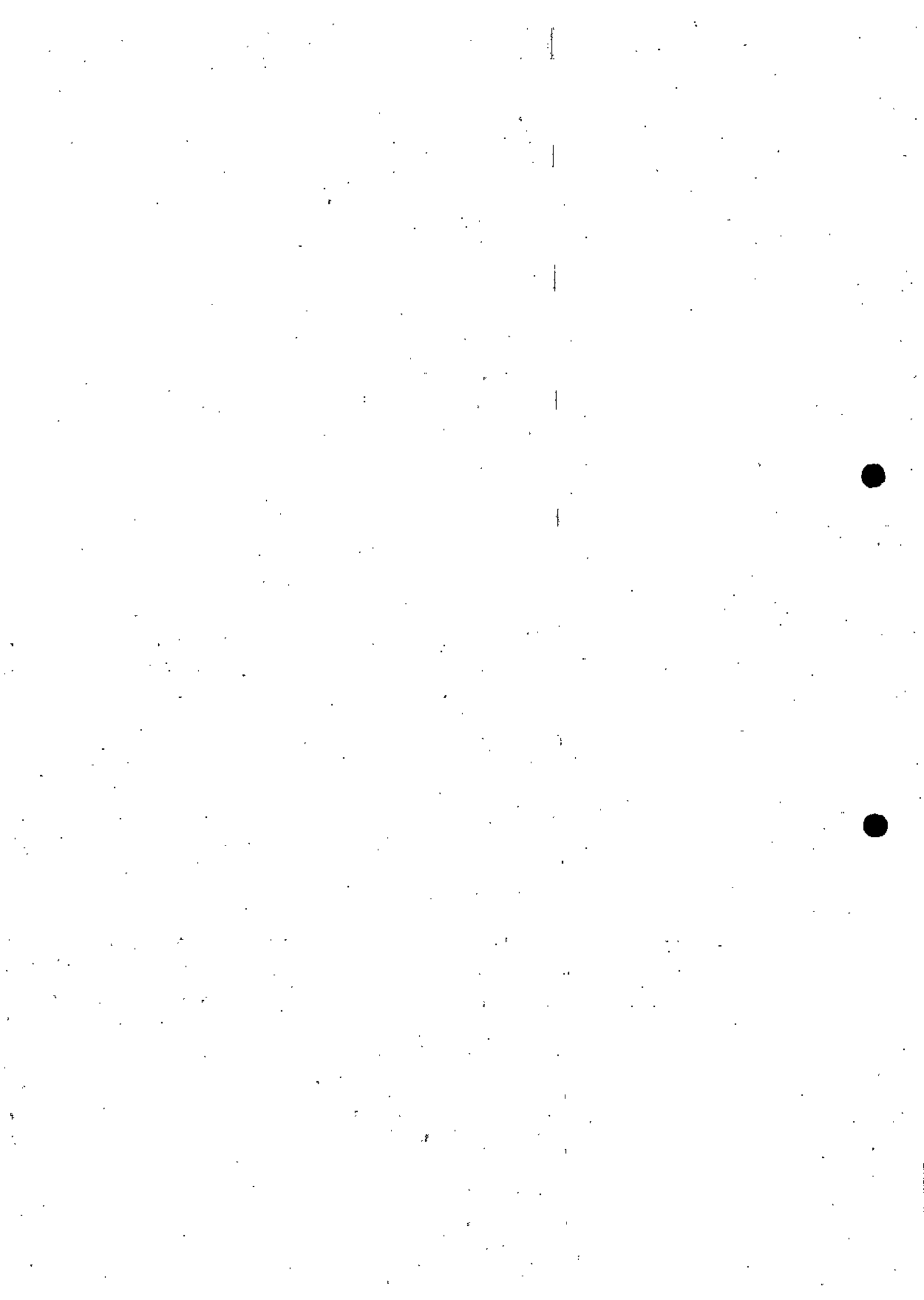


usando o sistema CTD+Rosette a partir de uma plataforma flutuante em estações previamente definidas. O CTD deverá ser munido de, pelo menos, sensores de turbidez, fluorescência, temperatura da água, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido.

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

Conforme o Anexo 3, a linha de fundeio deve contemplar pelo menos uma medição de parâmetros físico-químicos da água junto ao fundo e outra próxima a superfície, sendo previsto pelo menos um ponto a aproximadamente -15m, na área conhecida como depocentro de lama (Quaresma *et al.*, 2015), um ponto mais ao Norte, a cerca de -20m de profundidade, o terceiro ponto a cerca de -40m, um ponto em frente à desembocadura do sistema do Piraquê-açu / Piraquê-Mirim próximo de -20m, na região da REVIS, e um ponto ao norte, na profundidade de 20m, adjacente à região de Degredo. A frequência de funcionamento dos equipamentos irá depender da profundidade em que serão alocados. Os ADPs devem operar com medições horárias de corrente e a cada duas horas para medição de altura, período e direção de onda (cita-se que a medição pode ser feita em modelo de *bursts*, com frequência de 2 a 4 kHz). Os dados de temperatura, salinidade e turbidez devem ser obtidos a cada hora em sincronia com os dados de ADP.

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



O Anexo 3 define que os fundeios devem permanecer em funcionamento por no mínimo cinco anos, sendo os dados enviados em tempo real para uma estação em terra por rádio ou satélite.

- 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). Para as análises de água devem ser obtidas as seguintes amostras:

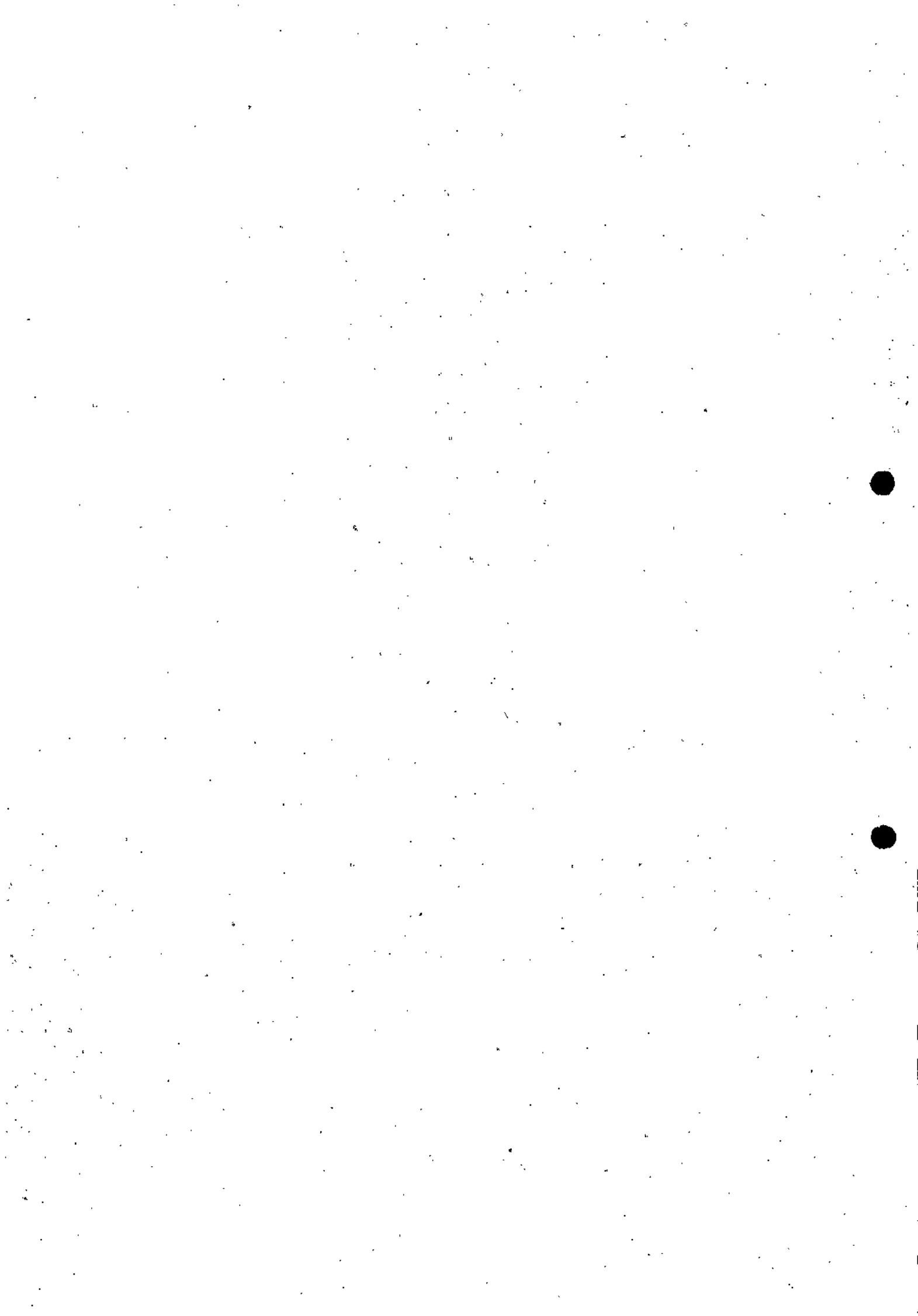
- ✓ 2000 ml para determinação de metais associados ao material coloidal;
- ✓ 1000 ml para determinação de mercúrio associado ao material coloidal;
- ✓ 500 mL para determinação de metais totais;
- ✓ 500 mL para determinação de metais dissolvidos.
- ✓ 500 mL para determinação de mercúrio total;
- ✓ 500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

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

A coleta de sedimento de fundo será realizada com *box corer*, buncando-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.

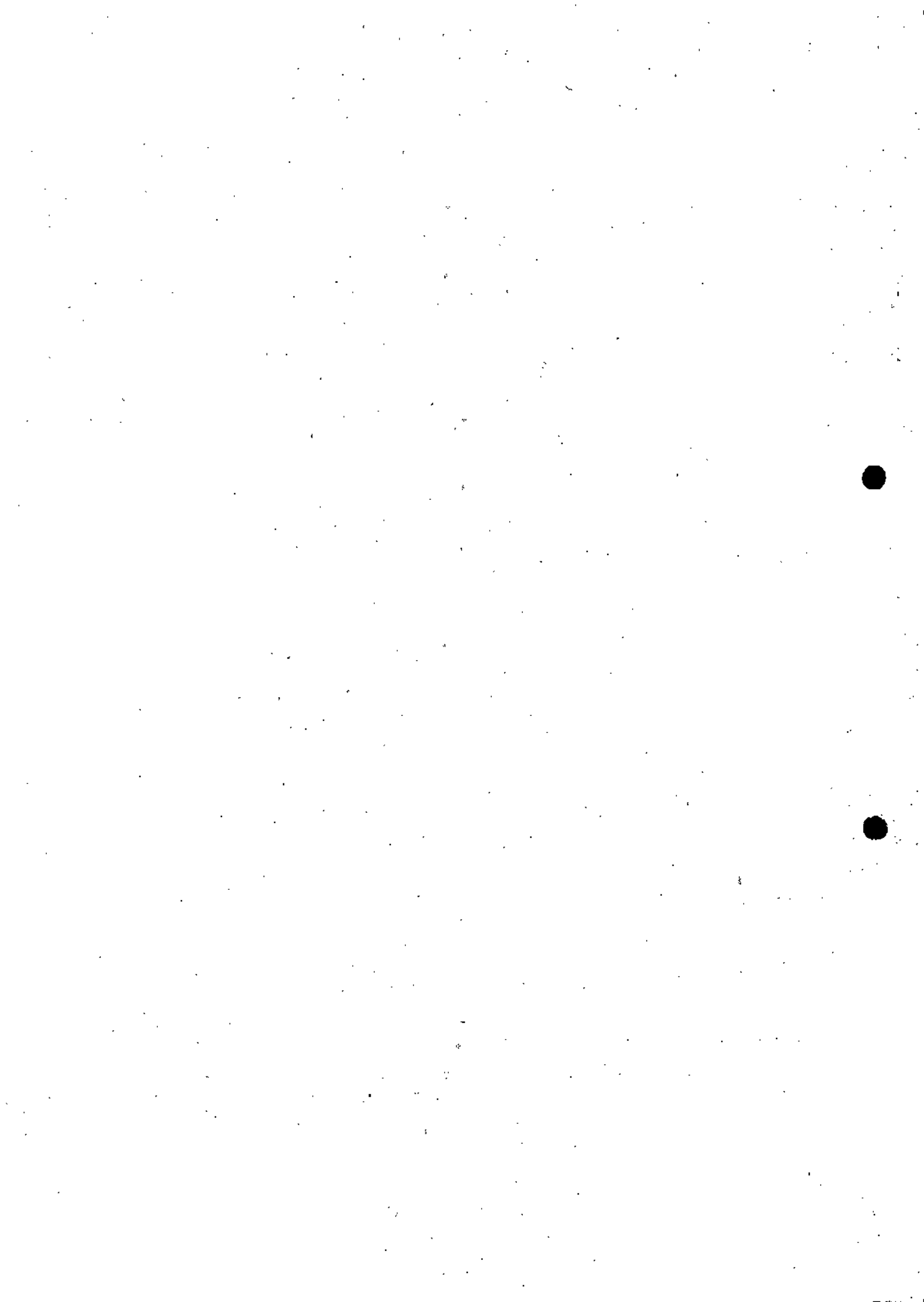


- ✓ Orgânicos: espátula de metal raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter em torno de 10g, armazenada em pote de alumínio ou vidro (carcinado) e congelada.
- ✓ Densidade: amostrar os centímetros superficiais usando um *ependorf* ou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

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

Quadro 8 - Parâmetros das amostragens de água e sedimento.

Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
Água	Metais	Totais, Dissolvidos, Particulados, Especificação e Mercúrio.
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis. Matéria orgânica dissolvida
	Elementar (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Enxofre.
	Isótopos (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Compostos orgânicos específicos.
	Nutrientes	Fósforo total, Fósforo dissolvido, Orto-fosfato, Nitrito, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Silício e N/P Total.
	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> .
Sedimento	Metals*	Sequencial (frações + total), Terras Raras e Mercúrio. *Alumínio; Arsênio; Bário; Boro; Cádmiu; Cálcio; Chumbo; Cobre; Cromo; Ferro; Fluoreto; Fósforo; Lítio; Magnésio;

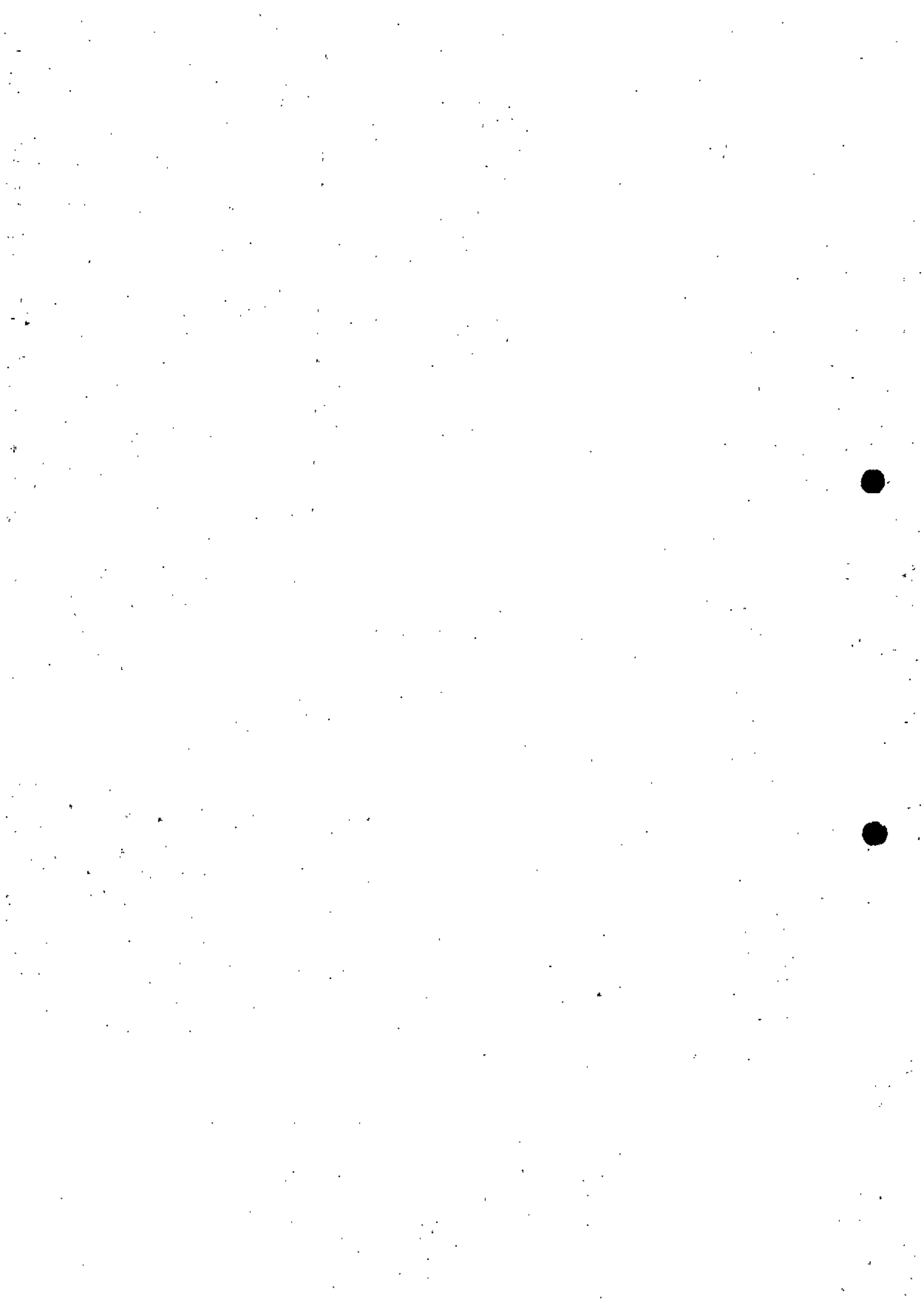


Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
		Manganês; Mercúrio; Níquel; Selênio; Vanádio; Zinco; Berílio; Cobalto; Fluoreto; Lítio; Vanádio
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis.
	Elementar	Carbono, Nitrogênio, Arsênio e Enxofre.
	Isótopos	Carbono, Nitrogênio, ²¹⁰ Pb/ ¹³⁷ Cs e Compostos orgânicos específicos.
	Nutrientes	Especiação de Ortofosfato em Água Intersticial, fósforo total.
	Parâmetros Físico-químicos	ORP, pH.

Fonte: Anexo 3, TR4.

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

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

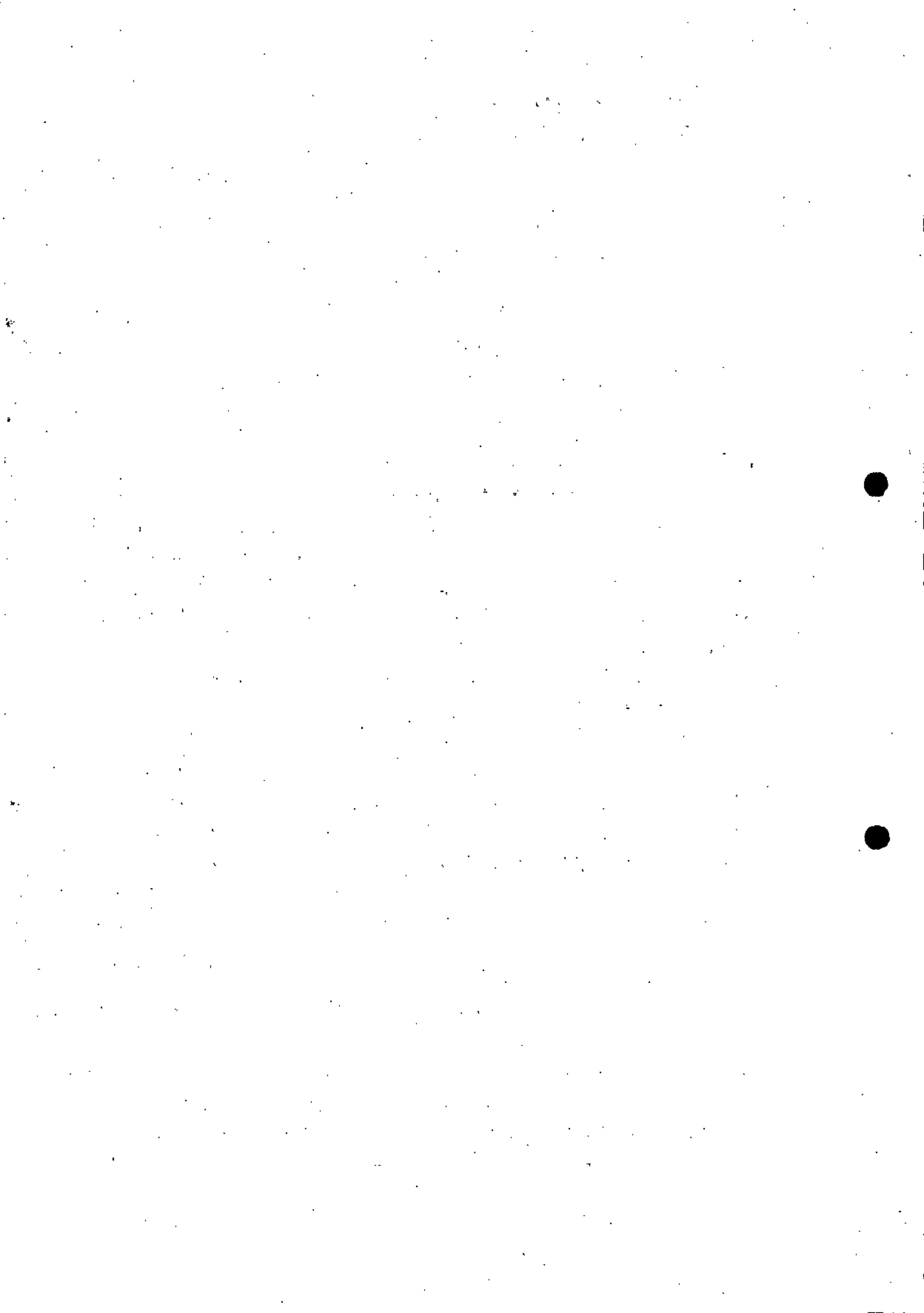


Para verificação da densidade, a amostra de sedimento deve ser coletada em recipiente de volume conhecido e previamente pesado e identificado. Em laboratório, esse recipiente deverá ser imediatamente pesado com o sedimento húmido e levado a estufa entre 40°C e 60°C para secagem. Após secagem, o recipiente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

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

Os testemunhos coletados entre Aracruz e Barra Nova devem ser abertos em duas metades, fotografados e subamostrados. A subamostragem será feita no máximo a cada 2 cm. Devem ser separadas alíquotas para determinação dos teores de carbonato de cálcio (dissolução por HCl a 10%) e matéria orgânica (queima em Mufla a 450°C) e análise granulométrica. A granulometria deve ser realizada em peneiramento a úmido para separação das frações lama e areia. Posteriormente, a fração areia será peneirada a seco a cada 0,5 phi e a fração lama analisada em granulômetro a laser. A alíquota remanescente da dissolução de carbonato de cálcio é usada para separação de minerais pesados por densidade, usando-se bromofórmio.

Pelo menos 10 subamostras devem ser analisadas para mineralogia de argilas e de minerais pesados, igualmente espaçadas ao longo do registro sedimentar. A metodologia para definição dos argilo-minerais será por difratometria de raio-x. O sedimento fino será pulverizado e, em seguida, injetado em um difratômetro com um



tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um *counter* de cintilação e um monocromador de grafite. Os padrões de difração serão gravados em modo *step-scan* em passos de 0.02°, a dois segundos por passo. As configurações dos *slits* de divergência, recebimento e espalhamento serão de 0.5°, 0.3 mm e 0.5°, respectivamente. Os padrões de difração serão gravados de 4° a 120°.

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

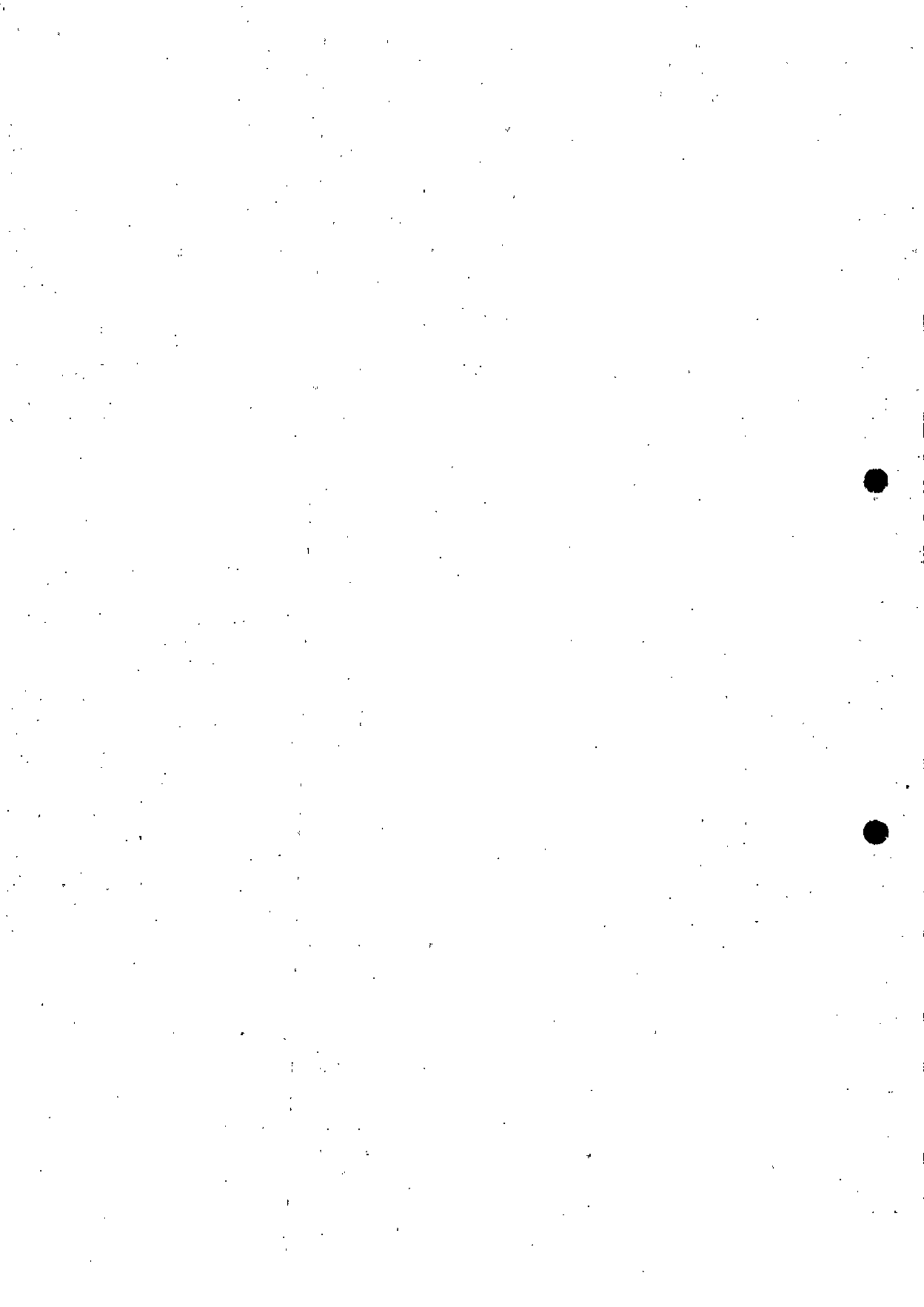
A espessura do depósito será investigada através de um levantamento geofísico com um perfilador de subfundo de alta frequência, usando um sistema de multifrequência variando de 20 a 0,5 kHz. O perfilador terá alta definição na superfície e permitirá o mapeamento dos refletores nos primeiros metros do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

- Procedimentos para amostragem da biota

Bentos - sedimento inconsolidado

A coleta das amostras será feita em substrato inconsolidado com o lançamento de amostradores tradicionais (*Box corer*, Van Veen) apropriados para este ambiente. A amostragem será feita em triplicata, garantindo que seja destinada uma amostra da primeira réplica para análise granulométrica. As amostras serão fotografadas logo quando o amostrador for içado a bordo.

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



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

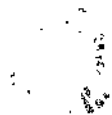
As análises do material triado irão considerar nível taxonômico até Família, no mínimo. A partir dos dados obtidos deverão ser calculadas a riqueza S, a diversidade α aparente de Shannon-Hill, a diversidade α real de Shannon-Wiener e a Dominância de Simpson. Para a estimativa das similaridades entre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

Macroalgas e Rodólitos

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

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

SECRET



Text block 1: Initial lines of the document, possibly a header or introductory paragraph.

Text block 2: A short line of text, possibly a date or reference number.

Text block 3: A large paragraph of text, the first main body of the document.



Text block 4: A second paragraph of text in the main body.



Text block 5: A third paragraph of text in the main body.

Text block 6: A fourth paragraph of text in the main body.

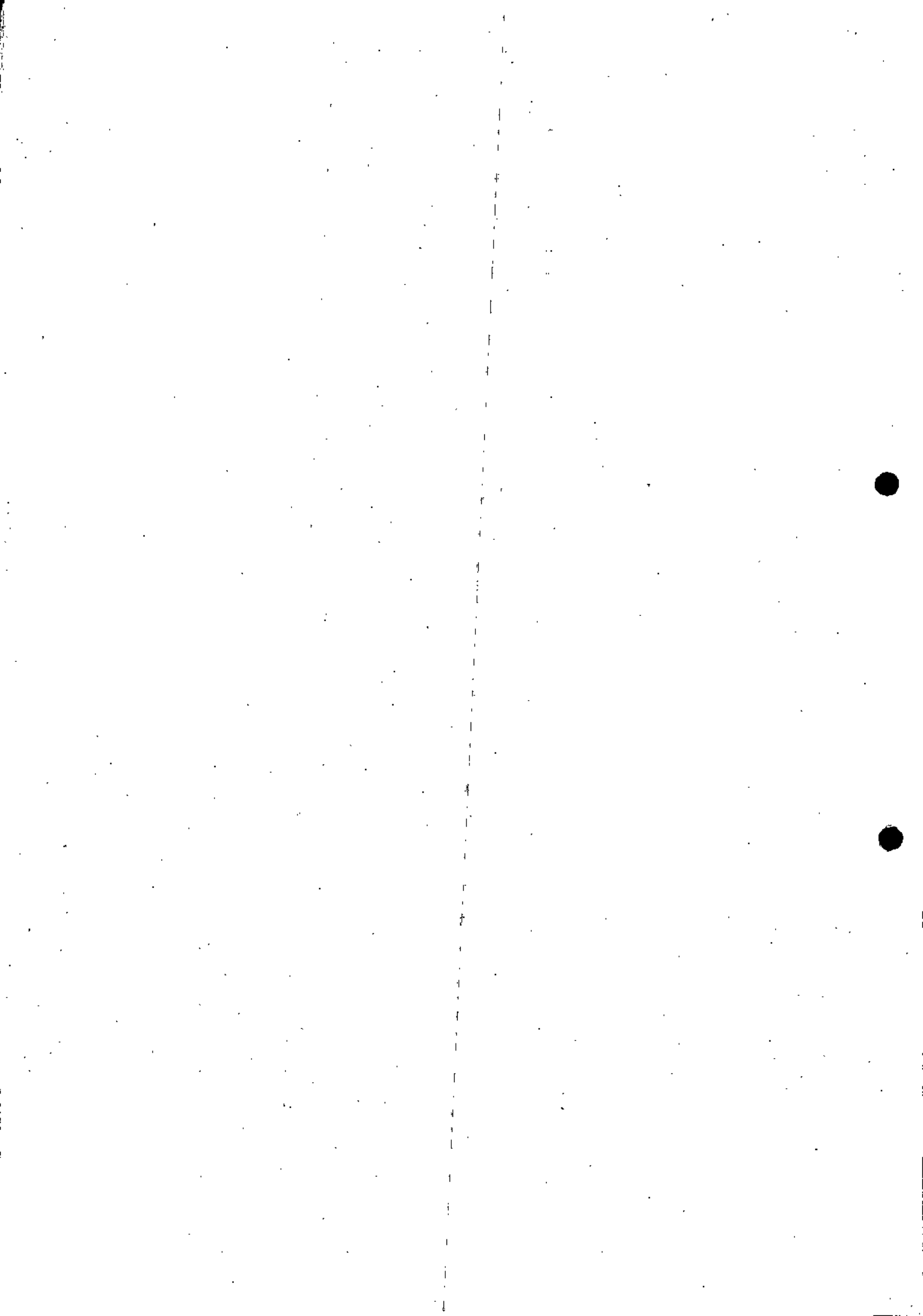
Rendimento de Fluorescência (F) e o Máximo Rendimento (Fm), gerando assim uma estimativa do rendimento fotossintético das zooxantelas associadas aos corais. Serão avaliados recifes submetidos a diferentes regimes oceanográficos (próximos e afastados da costa), em diferentes profundidades, e em diferentes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

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

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

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

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



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

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

3.4.1 Objetivos

São objetivos específicos deste estudo:

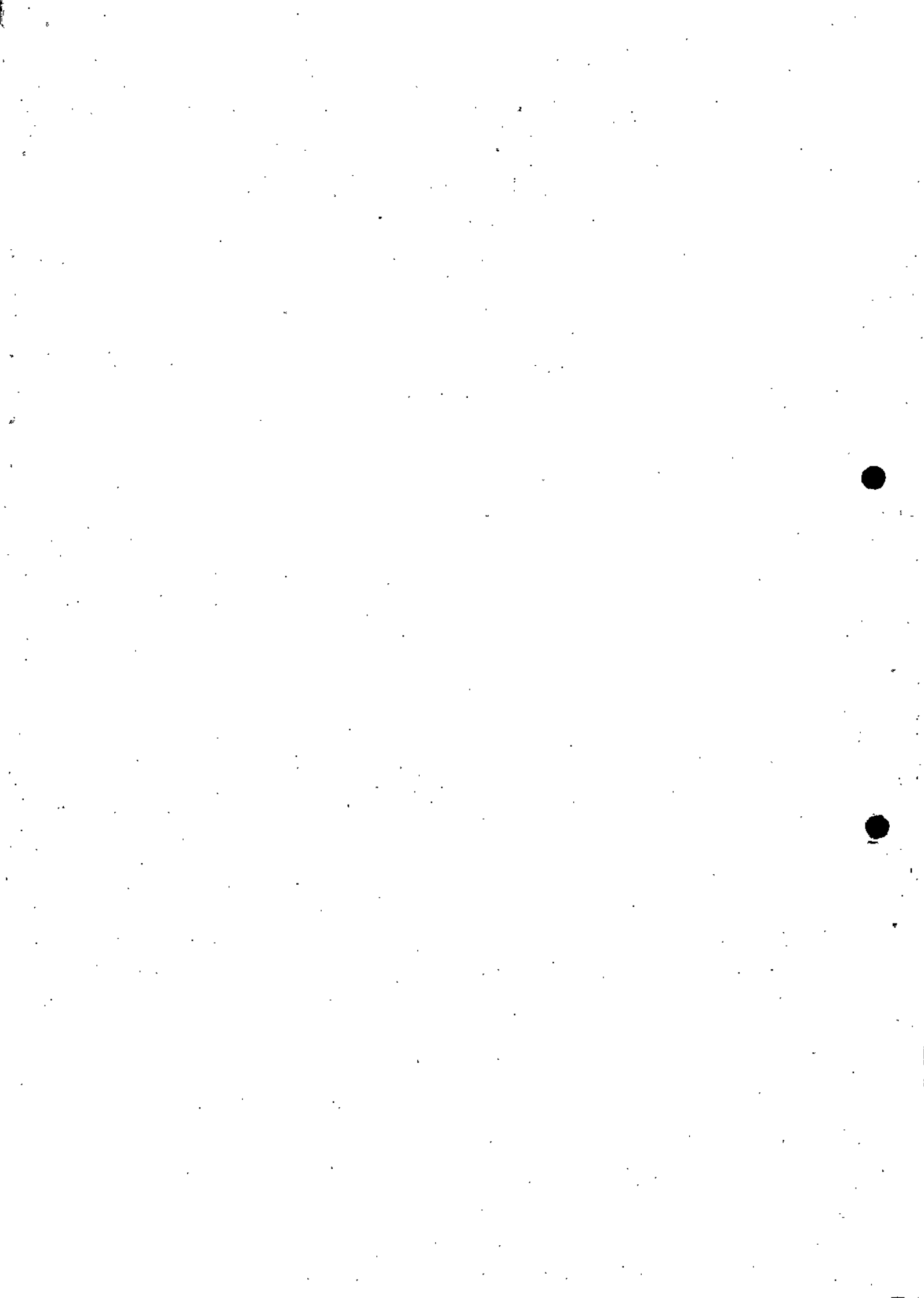
- Determinar o alcance máximo dos contaminantes ao longo da costa e seu deslocamento ao longo do tempo;
- Identificar os processos morfodinâmicos envolvidos na distribuição dos contaminantes;
- Verificar a possibilidade da contaminação atingir a berma alta da praia e a costa e, em caso afirmativo, em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

3.4.2 Área de Estudo

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

3.4.3 Metodologias

Serão realizados levantamentos de perfis topobatimétricos nas praias transversais à costa, com coleta de sedimentos para análises físicas, químicas e biológicas. Dados



batimétricos e de sedimentos devem ser investigados até a isóbata de 10 m com auxílio de embarcação e mergulhador, por meio de coleta superficial e testemunhagem.

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

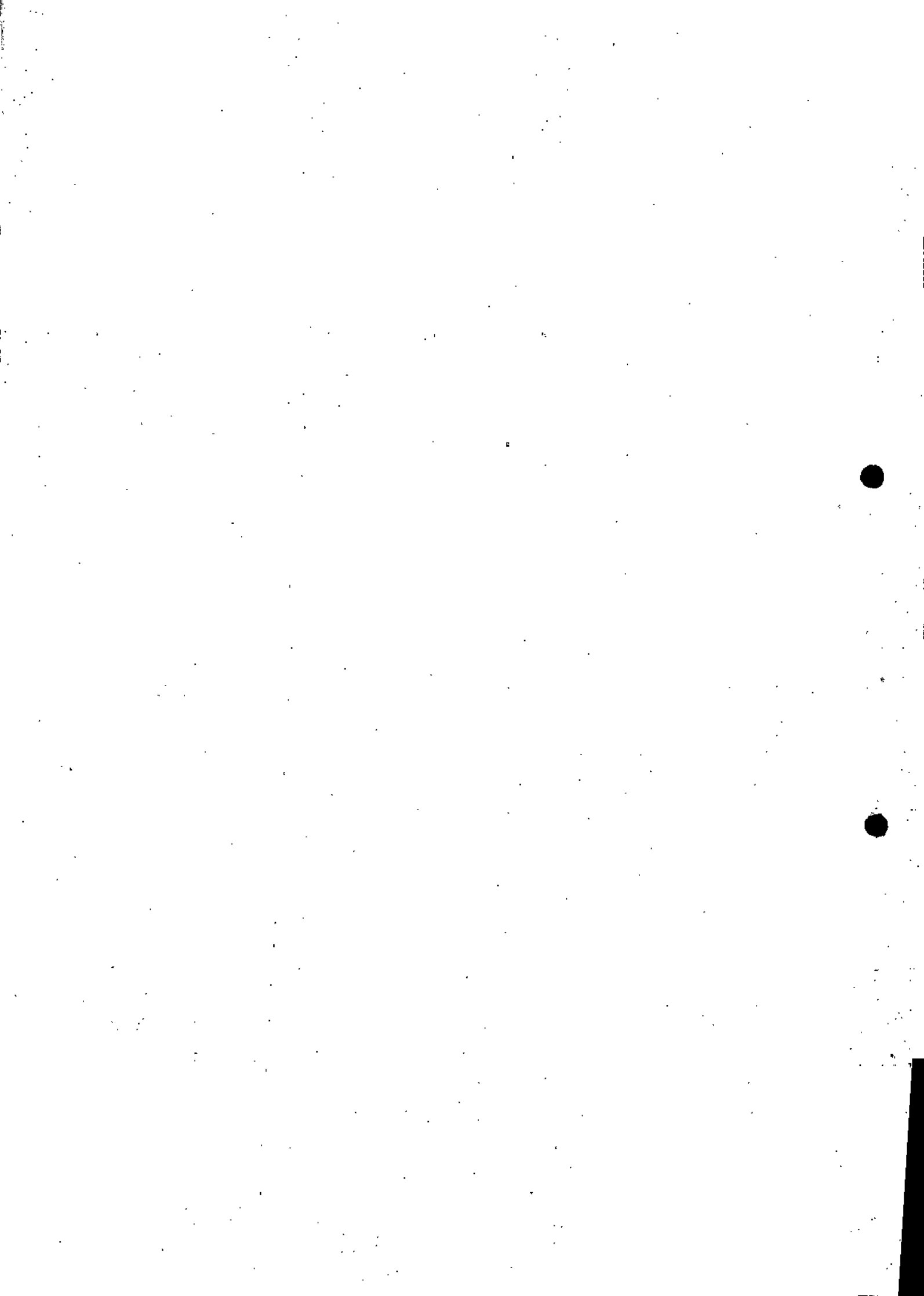
- Morfologia e sedimentologia

Caracterização multidecadal do clima de ondas

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

Monitoramento de perfis topobatimétricos

Perfis topobatimétricos serão monitorados ao longo da costa entre as estações de amostragem Aracruz 1 e Doce norte 5, consistindo de cinco perfis ao norte e cinco ao sul da foz do rio Doce. Os perfis serão levantados a partir do limite da pós-praia e devem se estender para a zona submarina até o limite da antepraia média, ou seja, até a profundidade de fechamento, em torno da isóbata de 10 m.



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

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

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

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

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

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



Análise sedimentológica

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

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

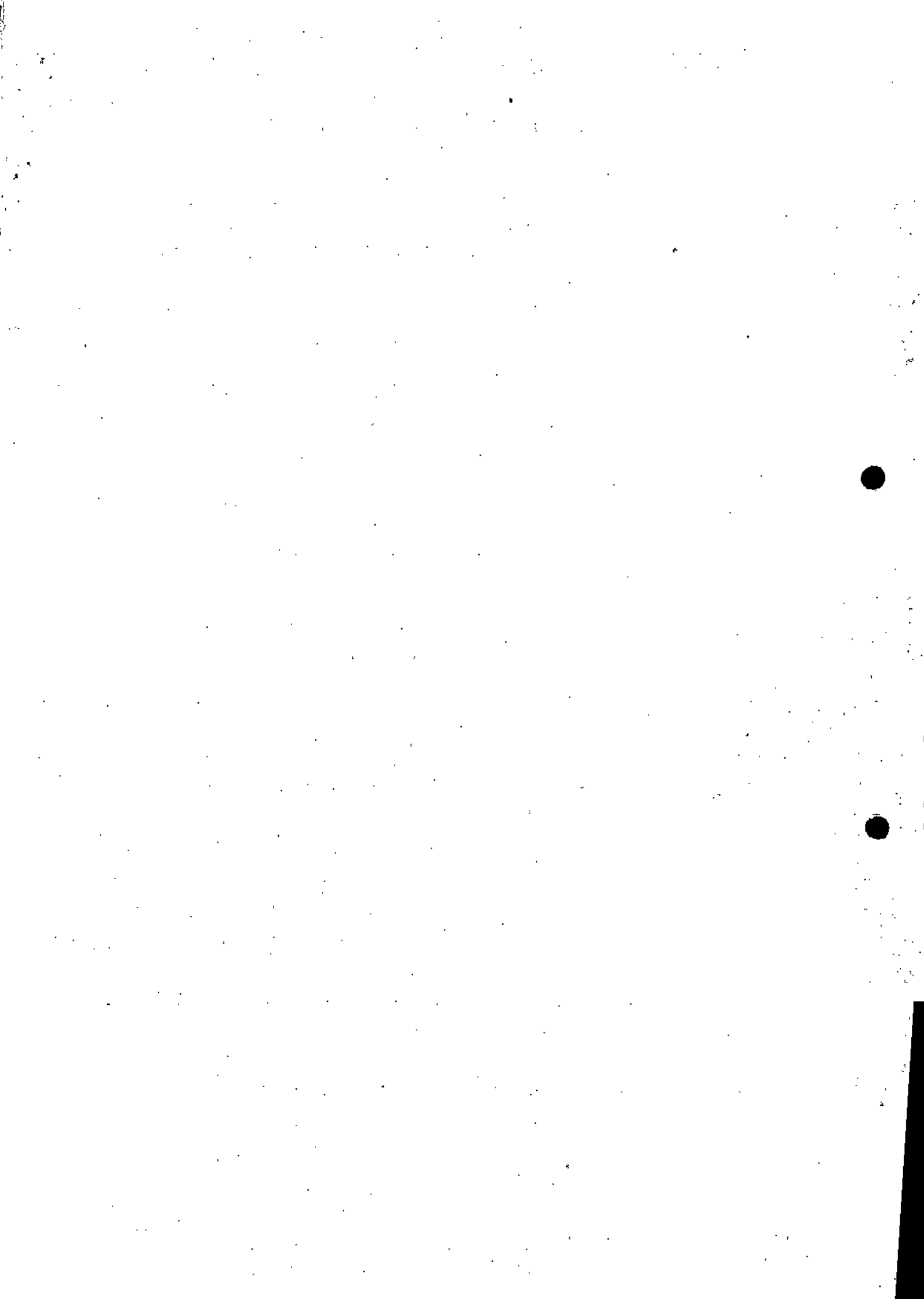
Análises granulométricas serão feitas por um granulômetro a laser, o que exige preparação prévia das amostras. Elas passarão por lavagem, secagem e quarteamento, com posterior extração e quantificação da matéria orgânica. Os parâmetros estatísticos seguirão Folk & Ward (1957) utilizando o *software*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

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

Integração morfodinâmica

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

A caracterização da morfodinâmica da praia e do clima de ondas permite avaliar a amplitude de mobilidade da praia e o alcance máximo vertical das ondas (*run up*).



conforme mencionado anteriormente, a partir dos modelos propostos por Stockdon *et al.* (2006) e Sallenger *et al.* (2002), entre outros.

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

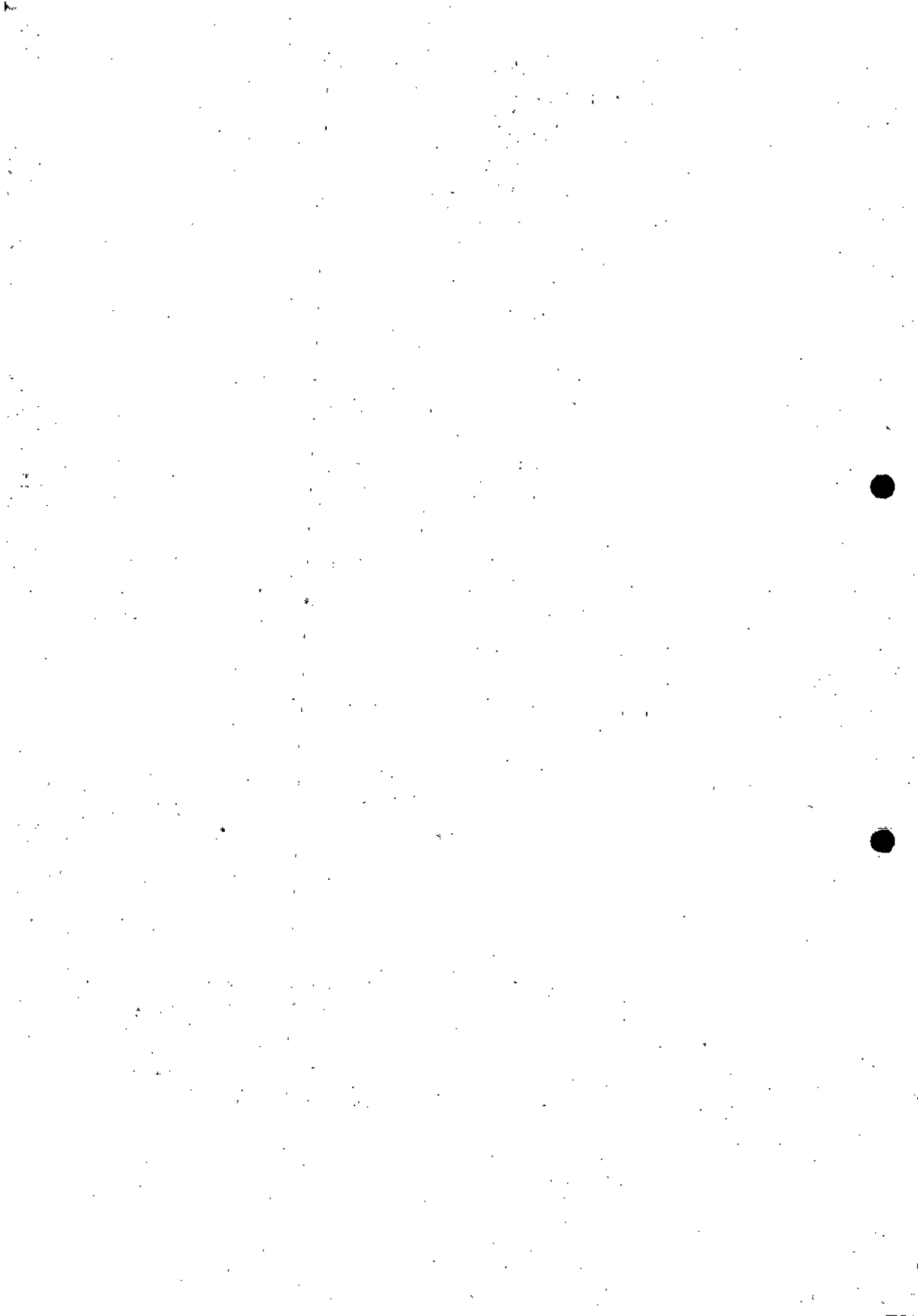
- Monitoramento da Fauna Bentônica

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

Procedimentos de campo

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

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



Análise das amostras e tratamento dos dados

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

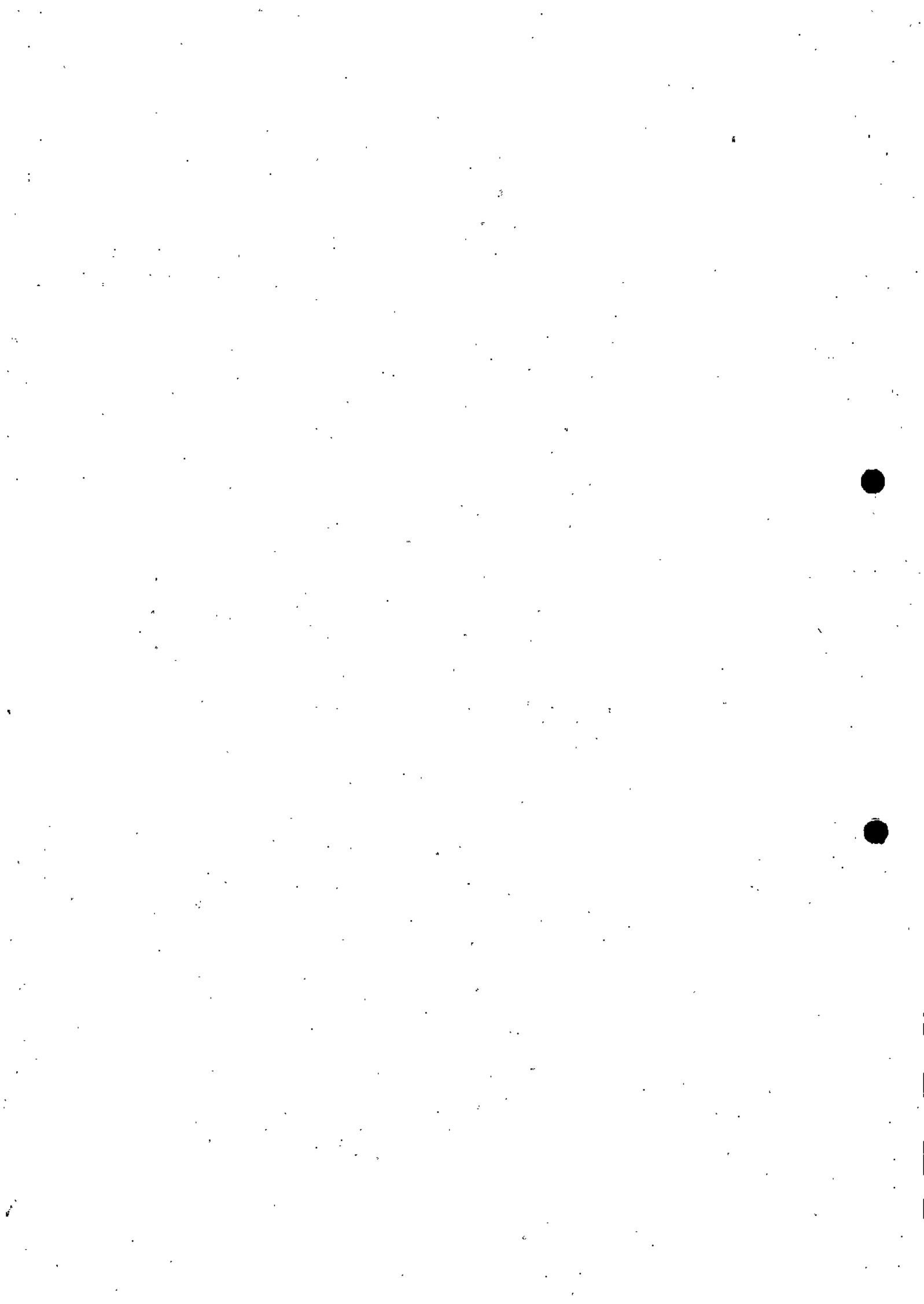
Os parâmetros densidade, riqueza (número de espécies), diversidade de Shannon-Wiener ($H' \log_2$) e densidade dos organismos mais abundantes são selecionados como descritores univariados da fauna bentônica. Para testar a significância destes descritores univariados, aplicam-se análises de variância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

- Monitoramento da qualidade química das areias

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

Pré-tratamento das amostras

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



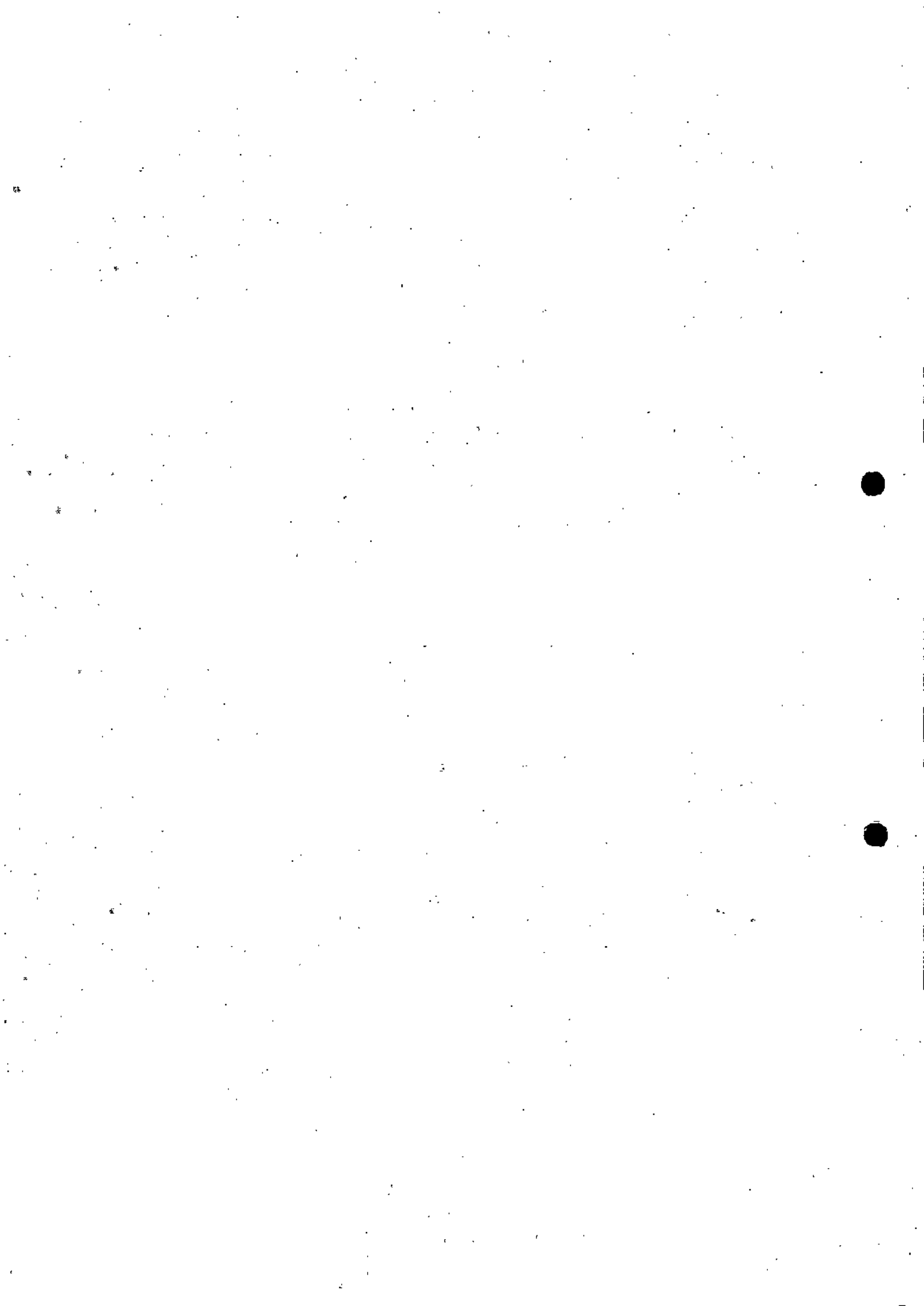
Fração Biodisponível: para extração desta fração, segue-se a norma ASTM D3974-09 (ASTM, 2015). Uma massa de amostra seca é pesada, transferida para um recipiente de polipropileno e adicionados 100 mL de HCl 2,5% m/v. Esta amostra é então submetida a agitador mecânico por 16 h a 25°C. O extrato obtido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

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

Análise das amostras e tratamento dos dados

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

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



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

3.4.4 Periodicidade

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

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

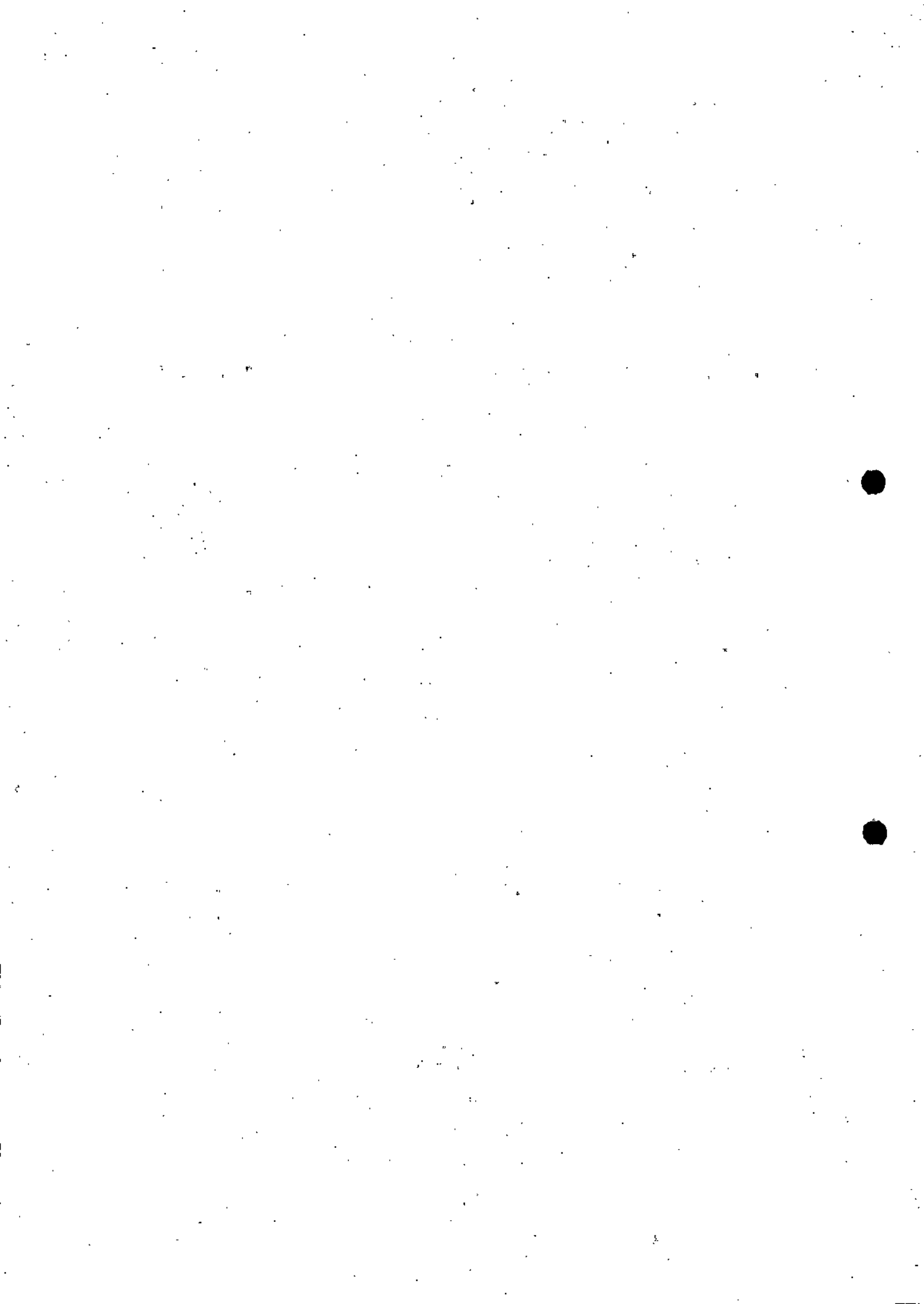
O Anexo 4 ressalta, porém, que a periodicidade e abrangência geográfica das campanhas podem ser alteradas conforme geração e interpretação dos resultados. Por isso, é prevista a realização de uma campanha em caso de tempestade excepcional, pois isto poderá remobilizar sedimentos da plataforma e antepraia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

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

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

3.5.1 Metodologia

Conforme solicitado, o trabalho será dividido em: 1) Avaliação e monitoramento dos impactos na flora do rio Doce; 2) Estrutura dos manguezais de São Mateus, Barra Nova, Barra Seca, Barra do Riacho, Piraquê-açu e mirim e manguezais de franja do RVS de Santa Cruz - Aracruz; 3) Diagnóstico dos impactos sobre a fauna do



manguezal, compartimento caranguejos; 4) Diagnóstico de contaminação da vegetação do manguezal por metais; 5) Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê e 6) Avaliação da estrutura da formação arbustivo-herbácea das Restingas.

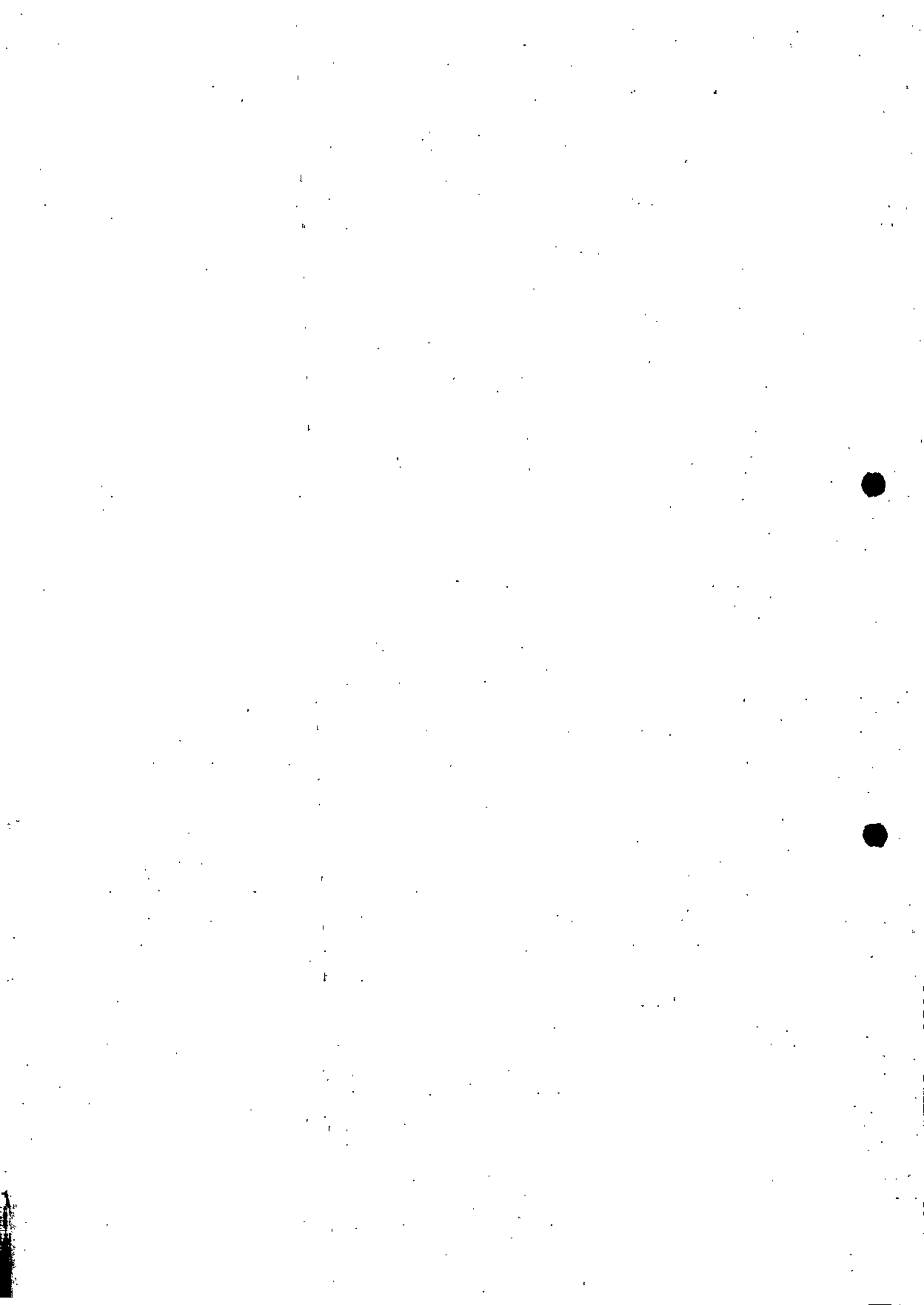
- Avaliação e monitoramento dos impactos na flora do rio Doce. Monitoramento da fitossociologia da vegetação paludal na foz do Rio Doce.

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

Serão realizadas saídas de campo para estimar a fitossociologia da vegetação paludal e halófita facultativa que irão compor a comunidade vegetal nas margens situadas na foz do rio Doce. Para tanto, serão realizadas cinco parcelas fixas com dimensões variáveis, de acordo com a estrutura da vegetação. O Anexo 5 define que as parcelas terão sua delimitação definida geograficamente com emprego de RTK (Trimble R4Base), que permite a obtenção de dados de latitude e longitude em tempo real e precisão de milímetros. No entanto, a Fundação Renova sugere que seja permitida a utilização de aparelhos GPS devido à facilidade de obtenção deste equipamento e otimização dos custos do projeto.

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

Os dados obtidos em campo serão avaliados quanto à densidade, composição, biomassa, abundância e índice de importância da espécie em cada parcela. Estes parâmetros serão acompanhados nas avaliações anuais e tratados estatisticamente,



de acordo com métodos não-paramétricos (ZAR, 1996), para avaliar e comparar se estão acontecendo modificações significativas na estrutura da comunidade.

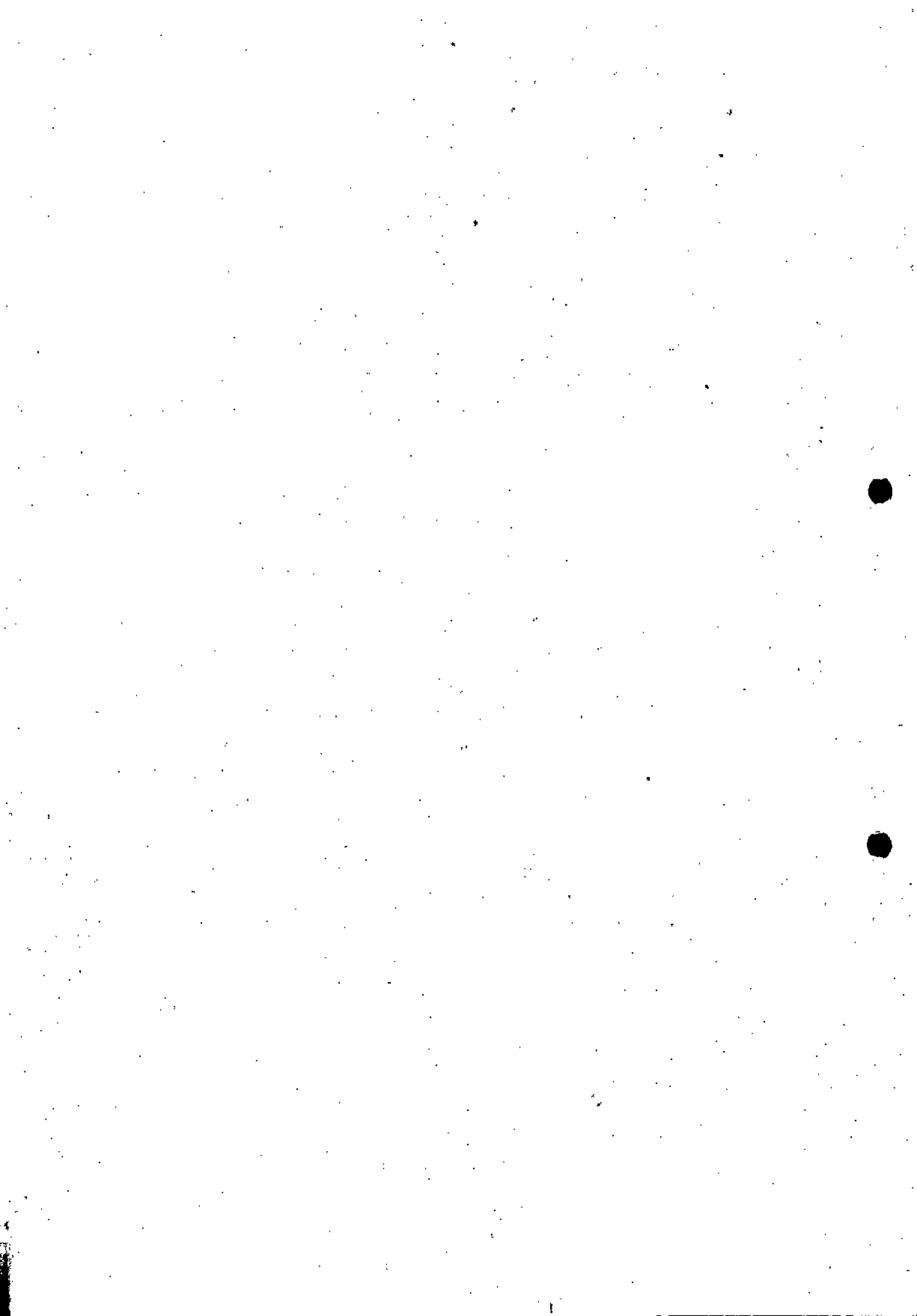
Para efeitos de identificação dos impactos relacionáveis aos sedimentos depositados e de origem do dano provocado pelo rompimento da barragem, deve-se coletar sedimentos em cada parcela, anualmente, para que sejam avaliados o grau de contaminação de metais, análise granulométrica e teor de matéria orgânica,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

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

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

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

A concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofilas a e b e pigmentos carotenoides) será obtida conforme descrito em Pascoalini (2014). Folhas maduras e intactas do segundo par serão coletadas ao acaso, representando os diferentes níveis



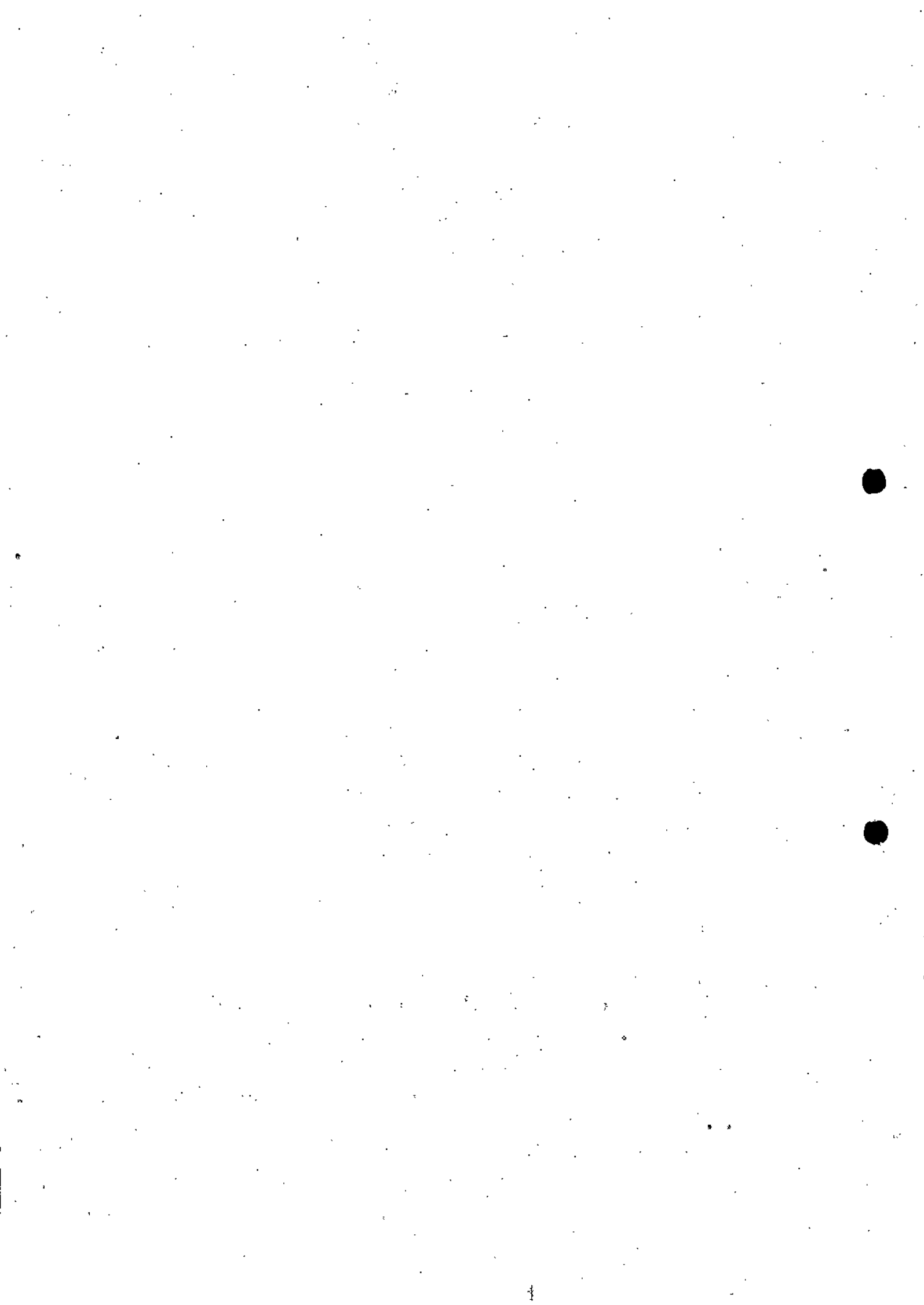
do bosque, até se obter 30 amostras. Em laboratório, será obtido peso fresco e seco, comprimento, largura e área foliar específica. A concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila e carotenoides) seguirá o descrito em Pascoalini (2014) e Santana (2014).

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

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

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

A análise da estrutura da vegetação seguirá a metodologia proposta por Schaeffer-Novelli & Cintrón (1986), sendo adotado o método de parcelas (três parcelas contíguas em cada local de estudo). O tamanho da parcela irá variar conforme o número de indivíduos, sendo considerado um mínimo de 30. Os parâmetros coletados serão a altura e o diâmetro à altura do peito (DAP) ou igual a 1,30 m. Em laboratório, serão calculados os parâmetros de área basal, diâmetro e altura média e densidade e dominância relativa das espécies no bosque. Desta forma, serão avaliadas florestas



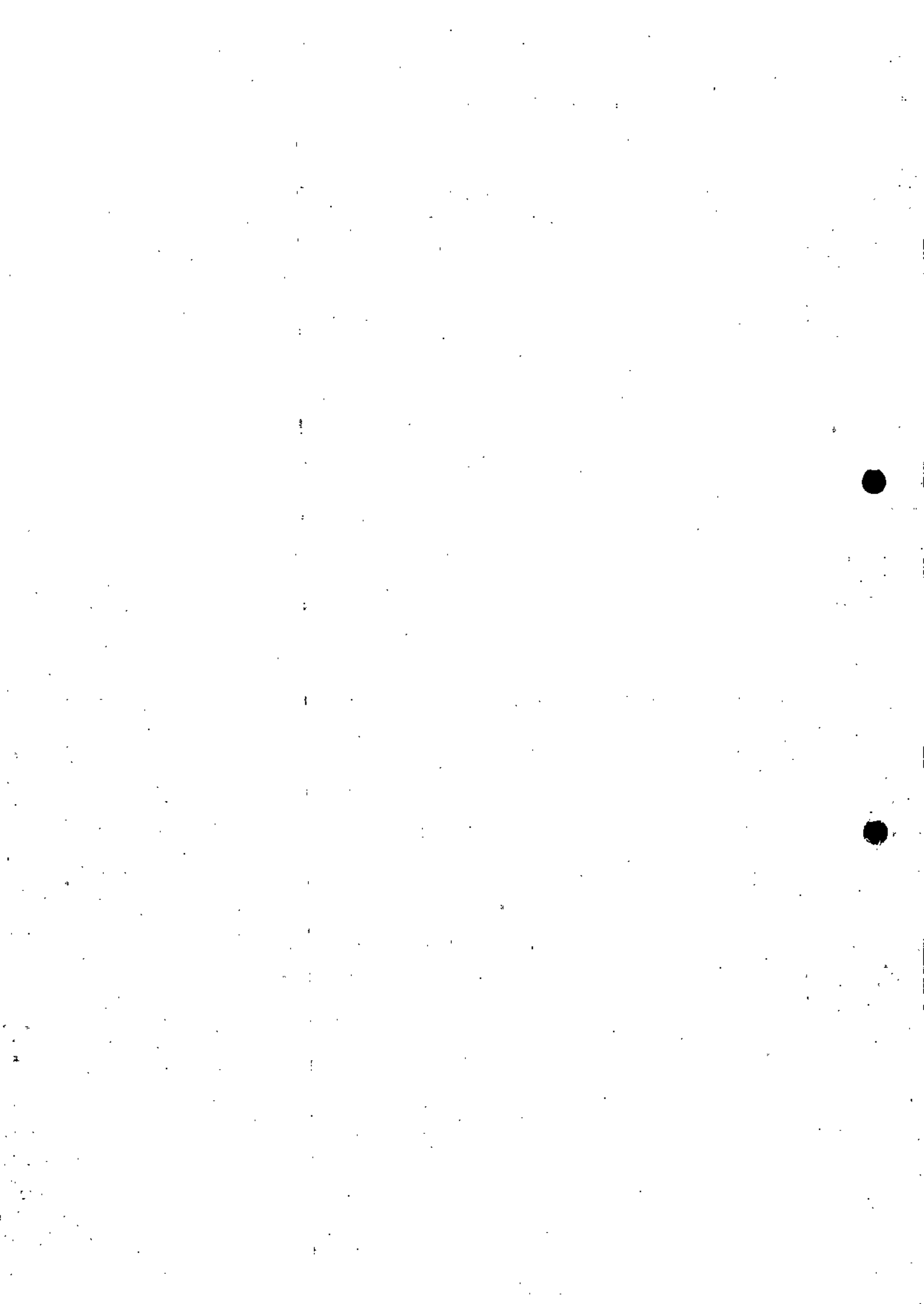
de franja e de bacia e dentro de cada parcela cinco árvores, caracterizando a distribuição de frequência dos diâmetros de todas as árvores que ocorrem na amostra, tendo seu incremento em diâmetro monitorados pela utilização de dendrômetros.

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

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

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

- a) r: indivíduos raros ou isolados;
- b) +: indivíduos pouco abundantes, ou de recobrimento muito fraco;
- c) I: indivíduos abundantes, mas de fraco recobrimento (até 1/20 da superfície);
- d) II: indivíduos abundantes cobrindo de 1/20 a 1/4 da superfície;
- e) III: indivíduos em qualquer número, cobrindo de 1/4 a 1/2 da superfície;
- f) IV: indivíduos em qualquer número, cobrindo de 1/2 a 3/4 da superfície;
- g) V: indivíduos em qualquer número, cobrindo mais de 3/4 da superfície.



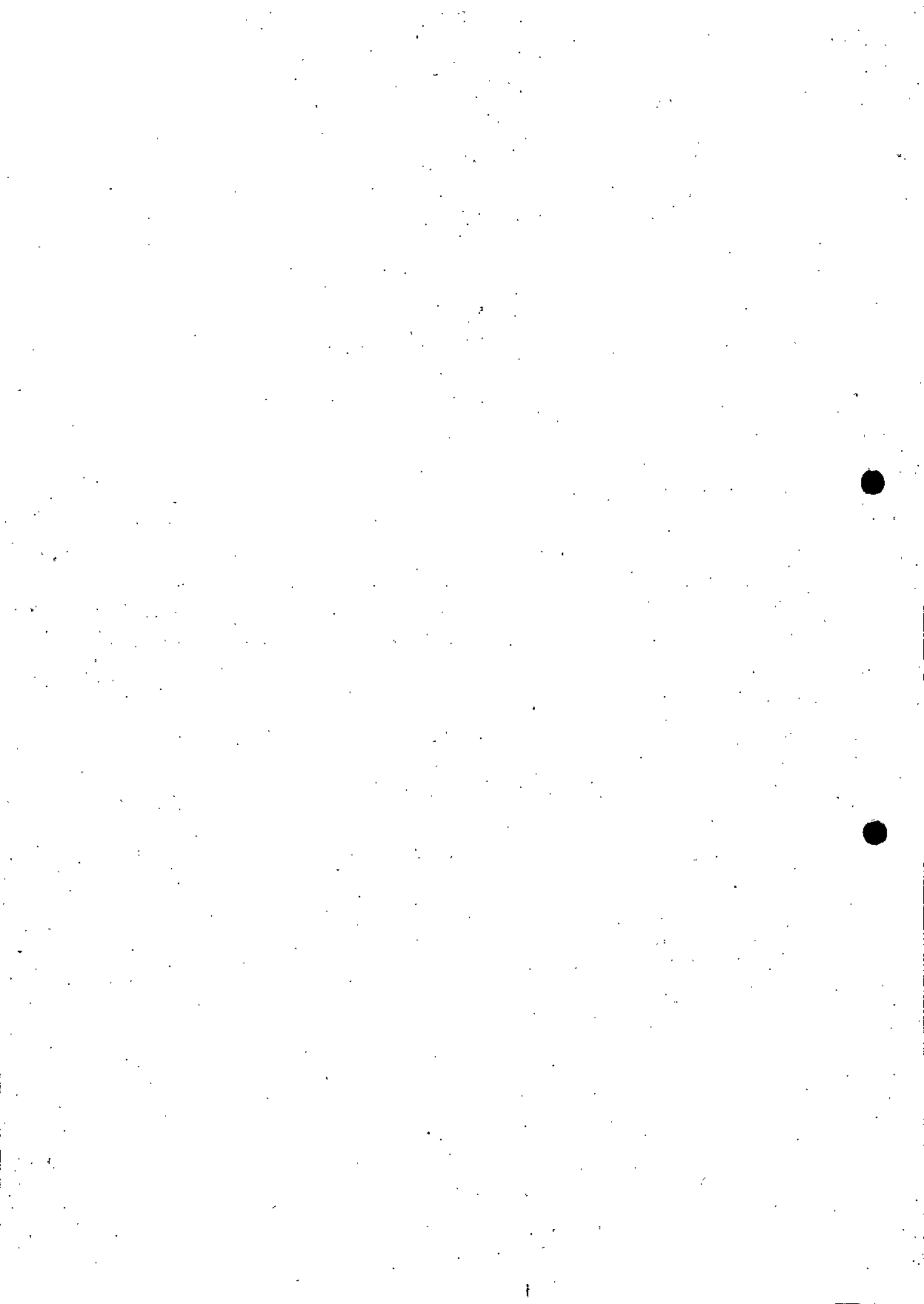
As parcelas serão monitoradas anualmente para avaliar a qualidade do bosque. Nestas oportunidades será quantificado o número de plântulas que ingressou na parcela e monitorados os dendrômetros instalados nas árvores.

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

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

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

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



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

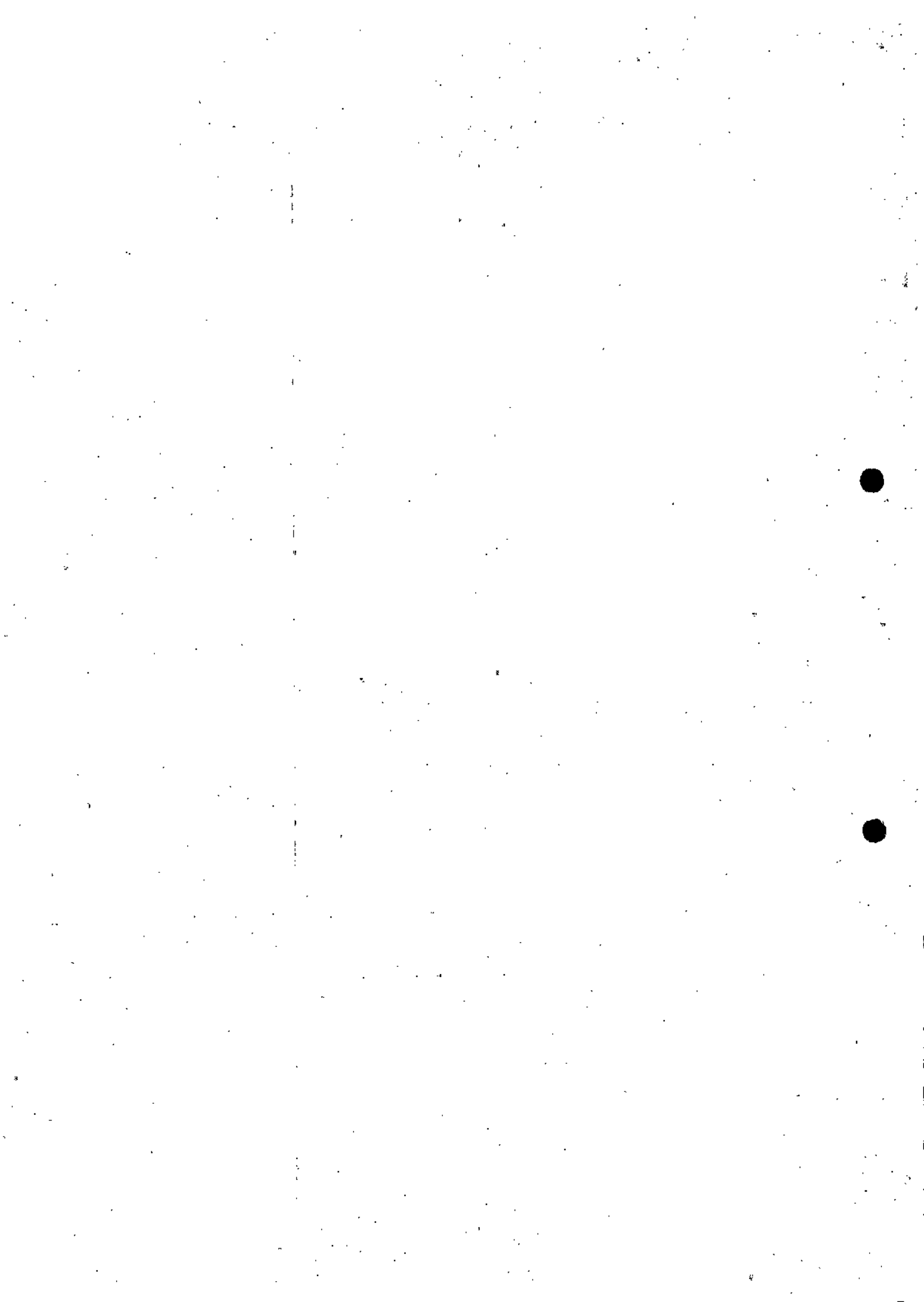
Os rios Piraquê-Açú e Piraquê-Mirim terão suas parcelas definidas em áreas onde já ocorrem levantamentos sobre a estrutura das populações de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii*, visando utilizar dados pretéritos para diagnóstico do impacto atual sobre a estrutura da população da espécie nesta bacia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

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

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

Conforme mencionado no Anexo 1, sugere-se que a quantidade de exemplares de guaiamum a ser coletada seja revista ou mesmo que a espécie não seja utilizada em ensaios destrutivos, pois a espécie encontra-se ameaçada de extinção na lista nacional (MMA, 2014).

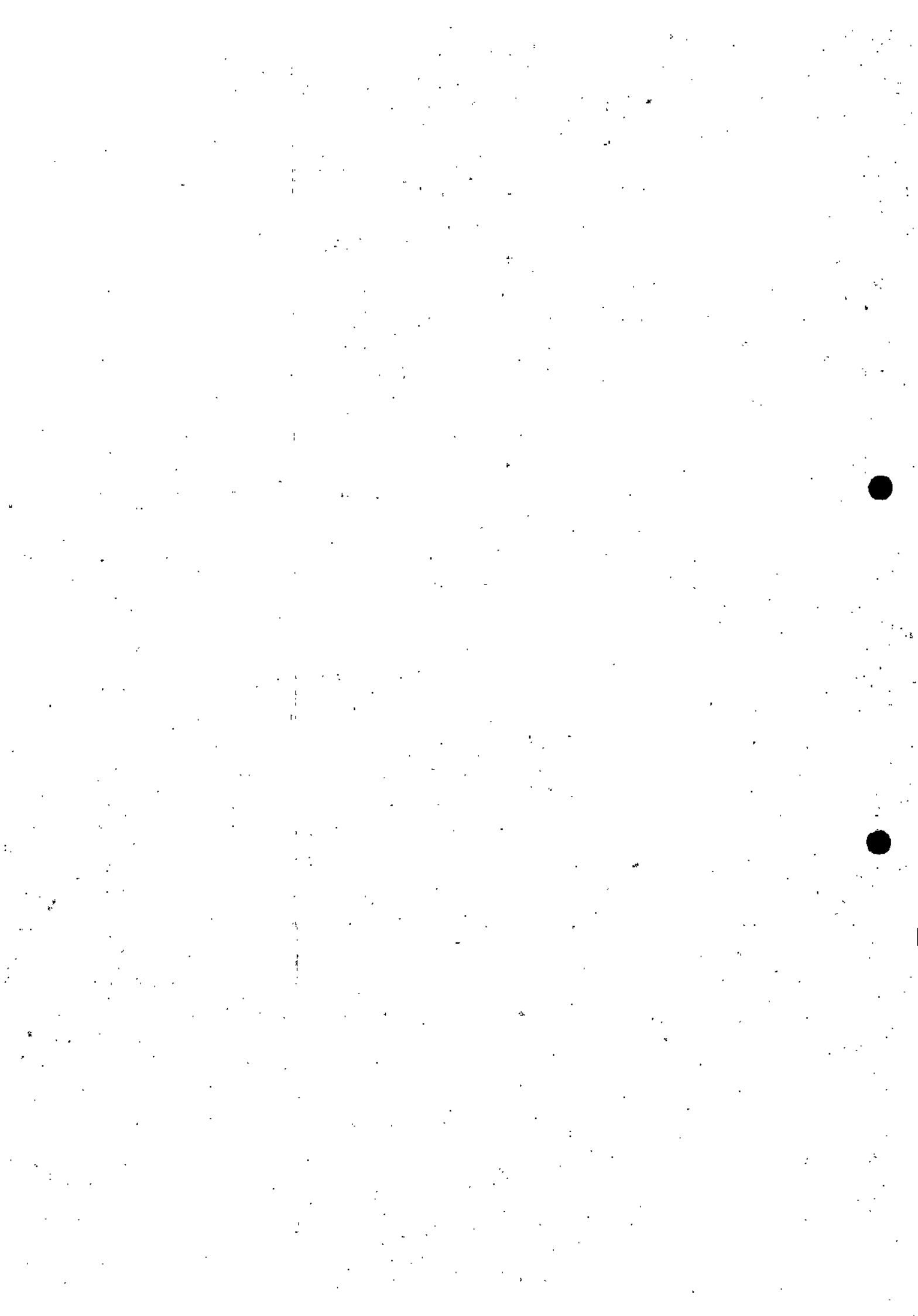
Após estas análises preliminares, será realizado tratamento estatístico empregando-se o programa Statistica (StaSoft) ou similar para avaliar os dados médios obtidos, diferenciados quanto aos parâmetros obtidos para fêmeas e machos por parcela, por bosque e por área de distribuição no estuário. Estas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



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

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

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



Diagnóstico de contaminação da vegetação do manguezal por metais

Os parâmetros a serem analisados e monitorados na vegetação de manguezal serão a concentração de metais (Arsênio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Ferro, Manganês, Mercúrio e Zinco) total e especiação química, concentração dos metais no sedimento superficial e também na água intersticial, realizando testemunhos de, no mínimo, 30 cm de profundidade.

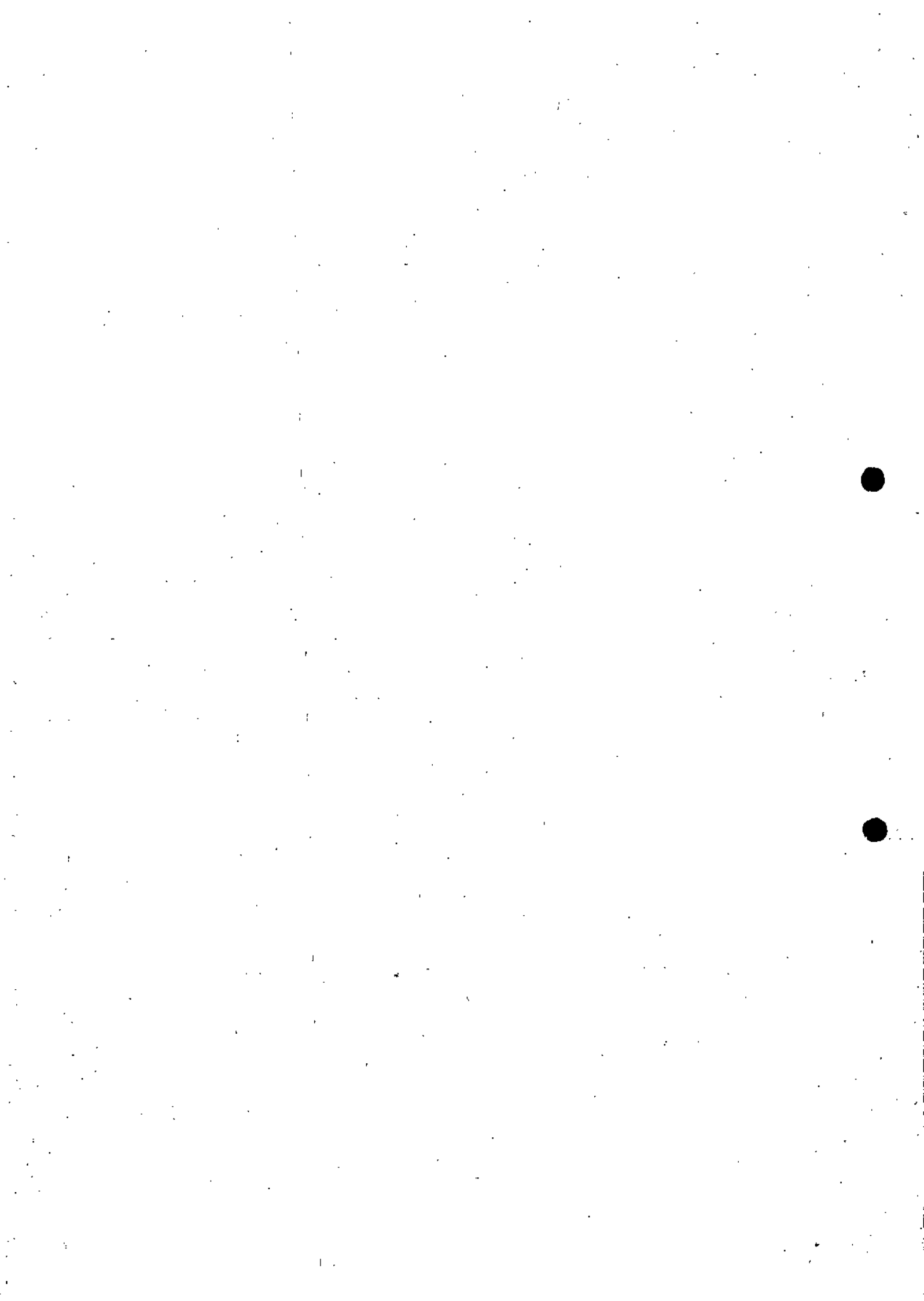
A análise dos metais na vegetação dos manguezais será efetuada nas raízes e folhas das espécies ocorrentes em cada bosque, visando avaliar a acumulação destes elementos ao longo dos diferentes estratos do bosque e compará-la com as condições de concentração de metais encontrada no sedimento e na água intersticial.

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

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

Avaliação da estrutura da formação arbustivo-herbácea das Restingas

Serão realizados inventários da estrutura da formação arbustivo-herbácea pelo método das parcelas, sendo alocadas três parcelas de dimensões 10 x 10 m (100 m² por parcela). Serão amostradas áreas com diferentes fitofisionomias e as parcelas alocadas de forma sistemática (Quadro 9). Para marcação das parcelas, serão utilizadas estacas de madeira e seus limites demarcados com cordões de algodão, sendo todas georreferenciadas.



Quadro 9 - Pontos de amostragem do Anexo 5 do TR4, Monitoramento da Restinga.

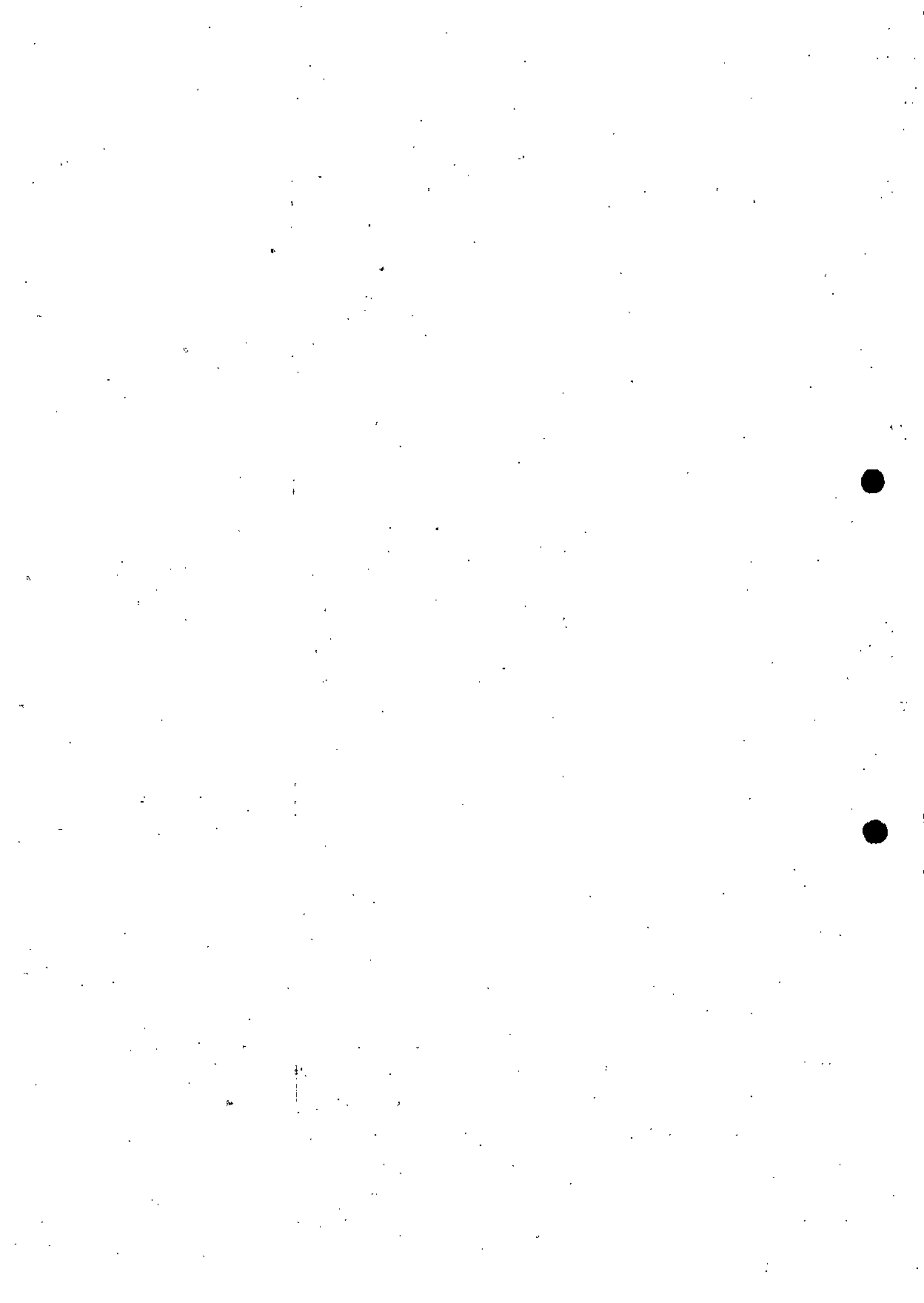
Ponto	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
	Latitude	Longitude
Ponto 1	422753,11	7941055,58
Ponto 2	421264,78	7930512,18
Ponto 3	421059,37	7921271,37
Ponto 4	422243,71	7903323,37
Ponto 5	424314,26	7887331,55
Ponto 6	426718,60	7869476,73
Ponto 7	408104,32	7825340,17
Ponto 8	393191,05	7813435,92

Fonte: Anexo 5, TR4.

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

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

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



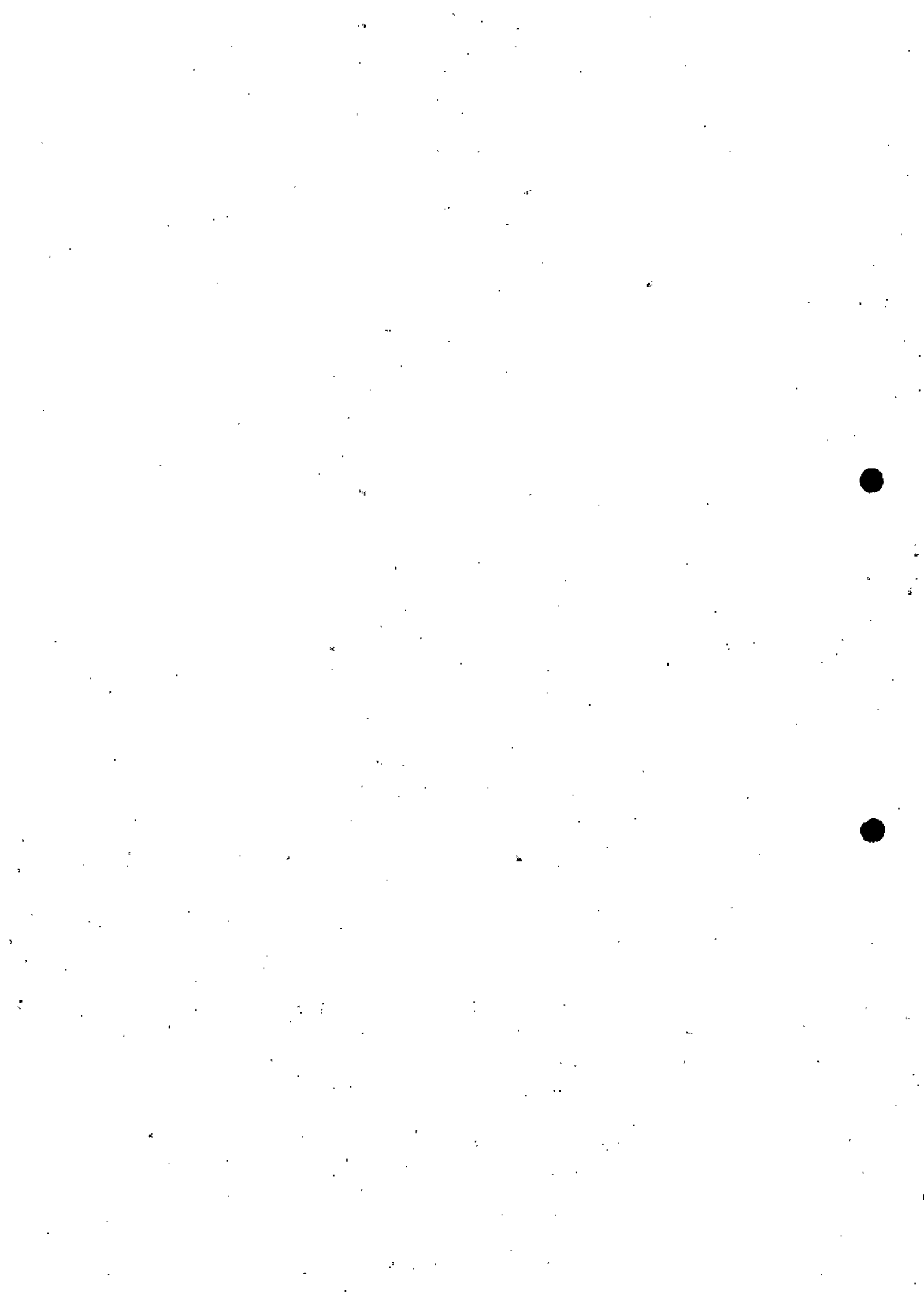
Será coletado sedimento em cada uma das parcelas lançadas para que sejam realizadas as análises granulométrica, química de rotina e matéria orgânica e análise de material foliar, para que sejam medidas as concentrações dos metais. Estas coletas serão realizadas em regime trimestral no primeiro ano e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

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

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

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

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



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

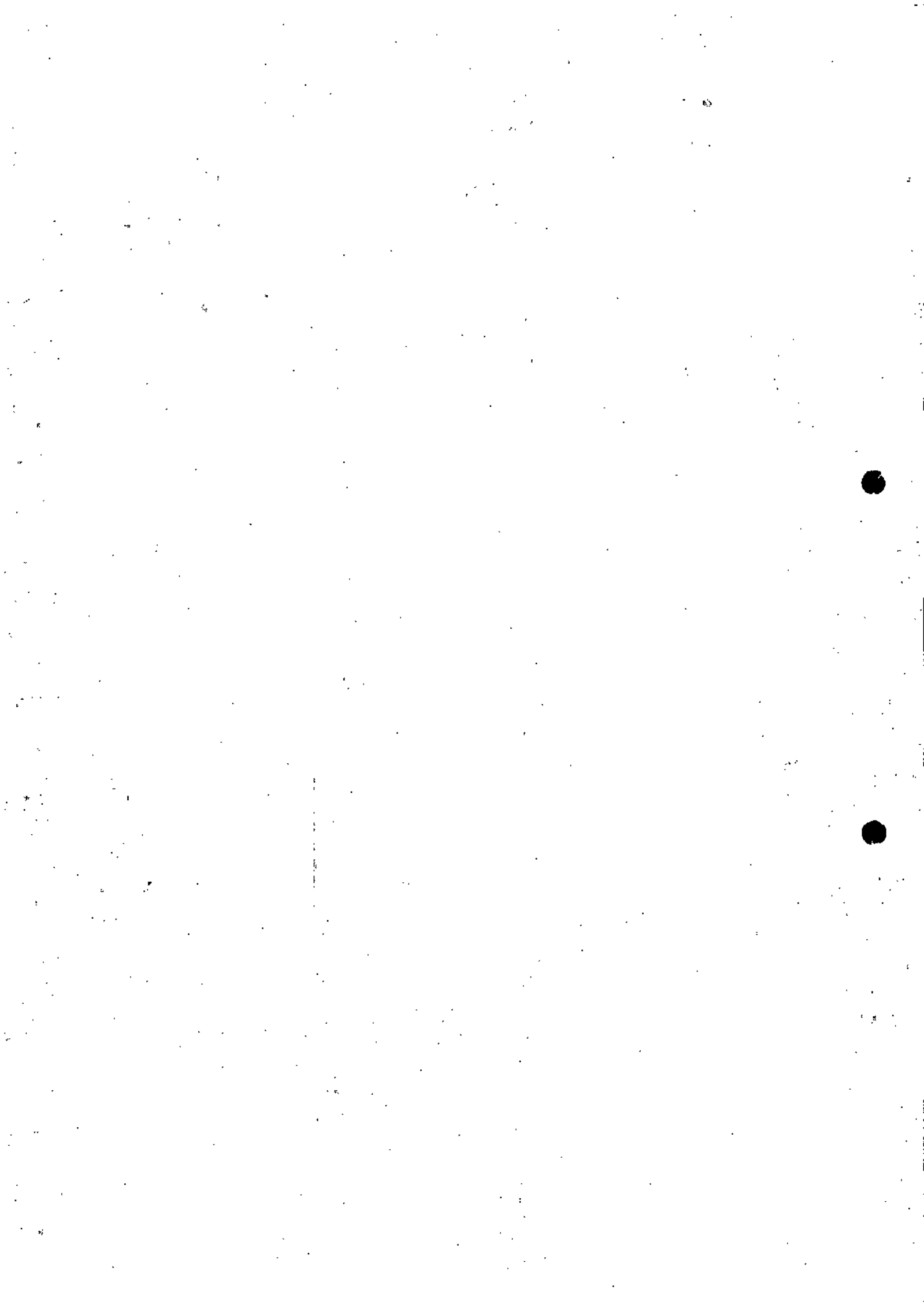
3.6.1 Objetivos

- Objetivo Geral

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

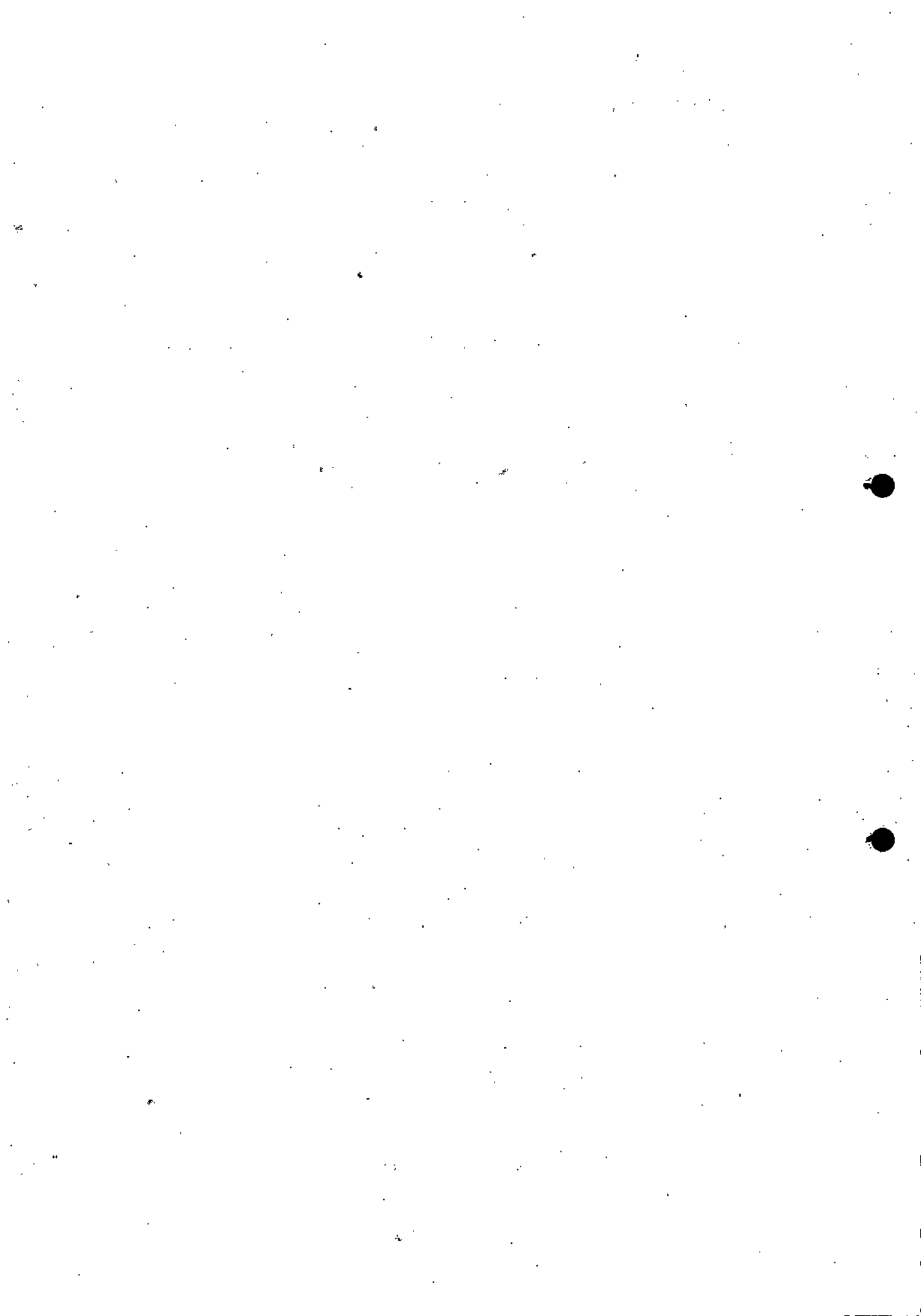
- Objetivos específicos

- 1) Avaliar e monitorar, por um período de cinco anos, a distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 2) Determinar e monitorar por um período de cinco anos, associação de tartarugas, aves e mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, incluindo a plataforma continental adjacente, o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz.
- 3) Monitorar, por um período de cinco anos, os encalhes de todos os cetáceos, tartarugas e aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível *causa mortis*.



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

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



3.6.2 Área de Estudo

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

3.6.3 Metodologias

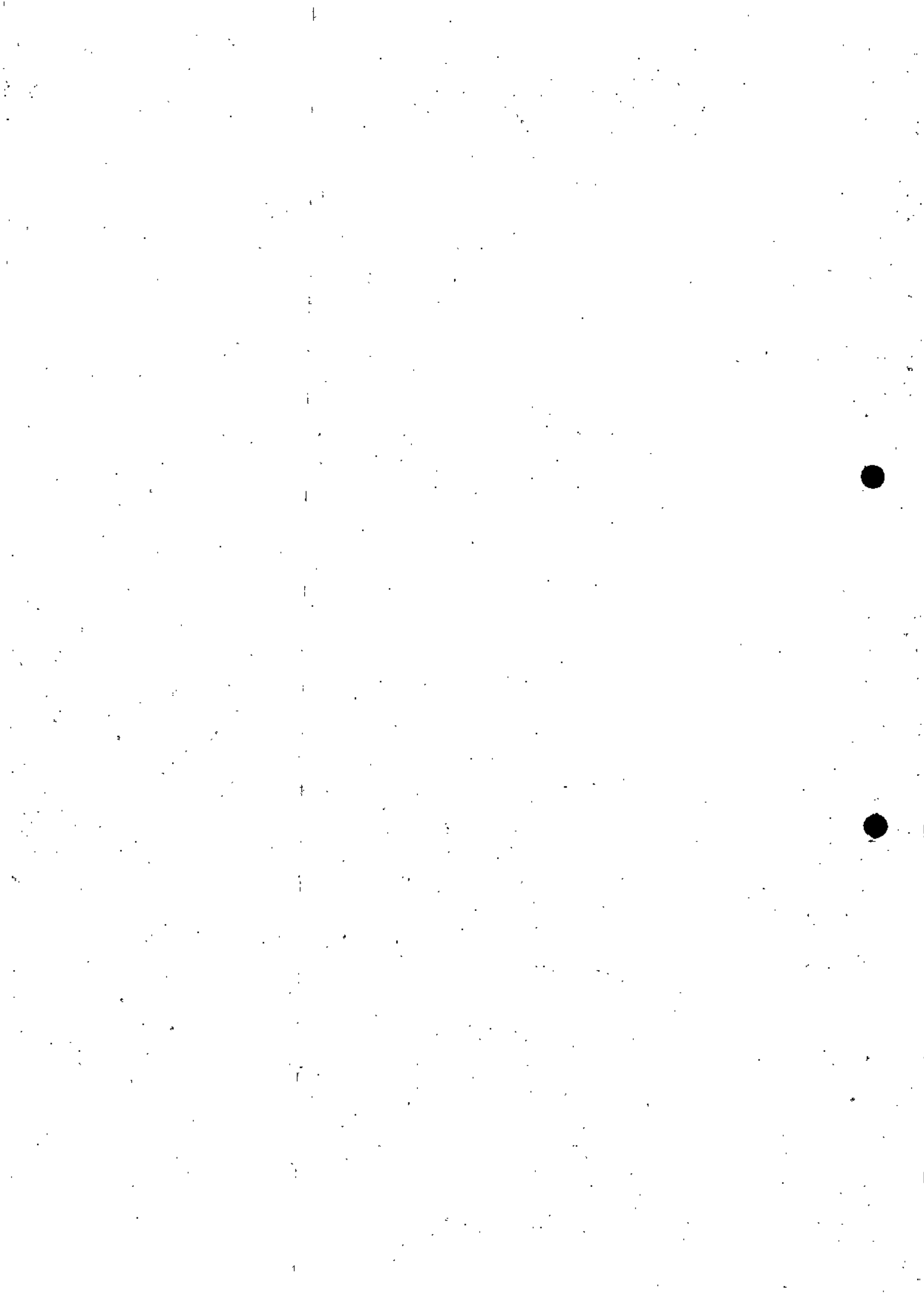
- Objetivo 1 - Avaliar e monitorar, por um período de cinco anos, a distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo o Parque Nacional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

Censos aéreos com aeronaves tripuladas

O Anexo 6 determina a utilização de censos aéreos com aeronaves tripuladas para avaliação da distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos. Define-se o uso da metodologia descrita por Buckland *et al.* (2001), de amostragem por distância em transectos lineares, brevemente explicada naquele Anexo.

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

Participarão quatro pesquisadores nos sobrevoos, que trabalharão de forma independente, sem comunicação entre eles. O Anexo exige que esta equipe tenha experiência mínima de três monitoramentos aéreos de toninhas, apesar deste



monitoramento também envolver tartarugas marinhas e aves. Mesmo com esta experiência, deve ser realizado um voo prévio de treinamento para calibração e padronização. Os pesquisadores se posicionam em pares na frente (janelas-bolha) e atrás (janelas planas). A metodologia de observação e coleta de dados é descrita no Anexo 6.

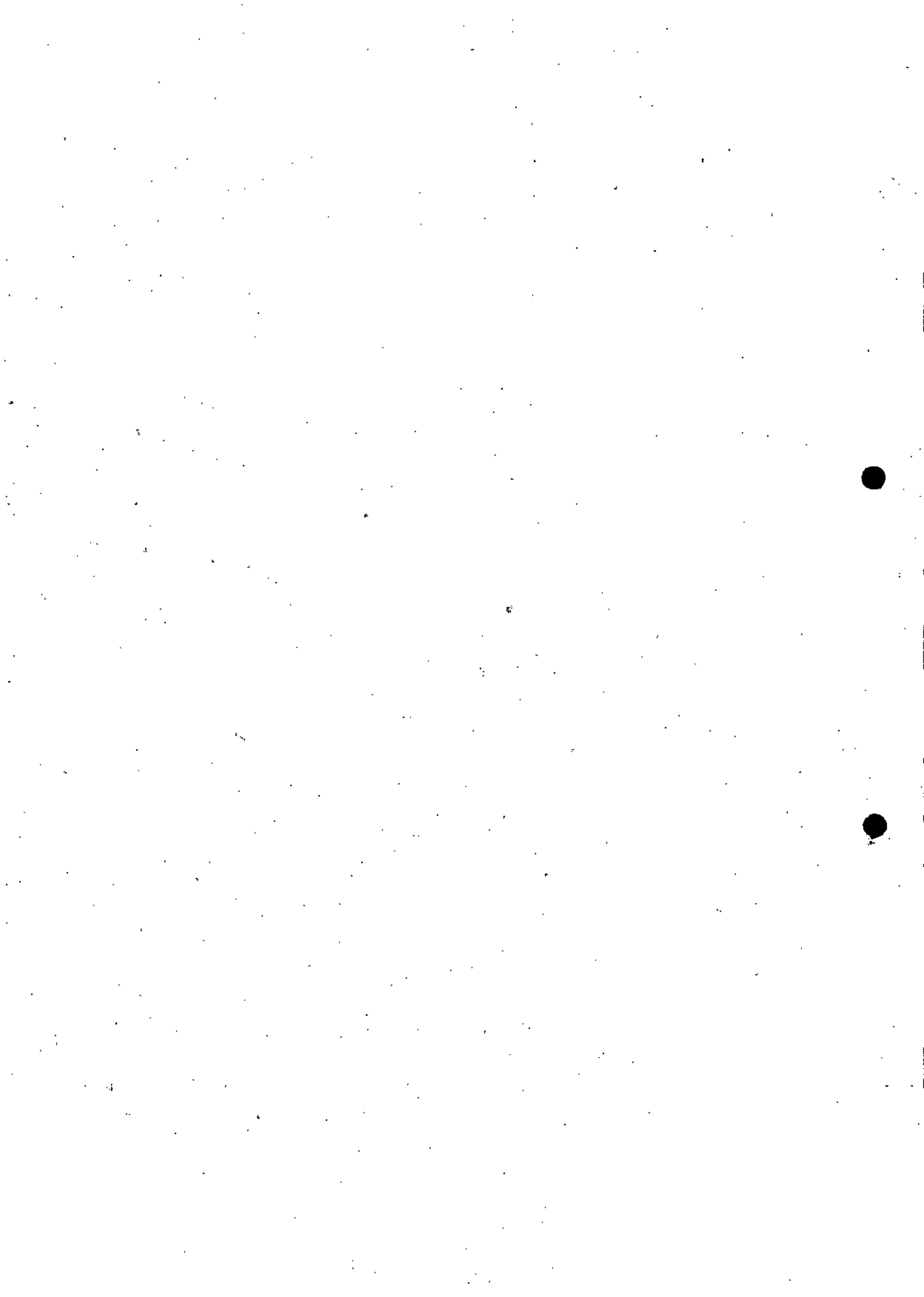
Dados populacionais das toninhas (*Pontoporia blainvillei*) obtidos antes da chegada da pluma de rejeitos ao mar devem ser utilizados para comparação quantitativa com os dados que se coletar no âmbito deste monitoramento, permitindo identificar também possíveis locais de afastamento dos animais.

Sugere-se a rediscussão da metodologia proposta para avaliação da distribuição, abundância e área de vida de tartarugas, aves e mamíferos marinhos. Entende-se estarem disponíveis métodos de menor custo e também efetivos para este tipo de estudo, como a utilização de aeronaves não-tripuladas dotadas de equipamentos de captura de vídeo. A metodologia proposta no Anexo 6 depende da utilização de aeronave específica, o que pode significar custos bastante elevados.

Censo embarcado

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

Cada estação de contagem deverá incluir as seguintes atividades, em ordem de execução: (1) contagem de aves seguidoras na popa da embarcação; (2) tomada de informações sobre variáveis espaciais, temporais e ambientais (data, hora, latitude e longitude, rumo e velocidade da embarcação, profundidade, tipo de atividade desenvolvida pelo barco, estado do mar conforme escala Beaufort, temperatura e salinidade da água, temperatura do ar, direção e intensidade do vento); (3) censo

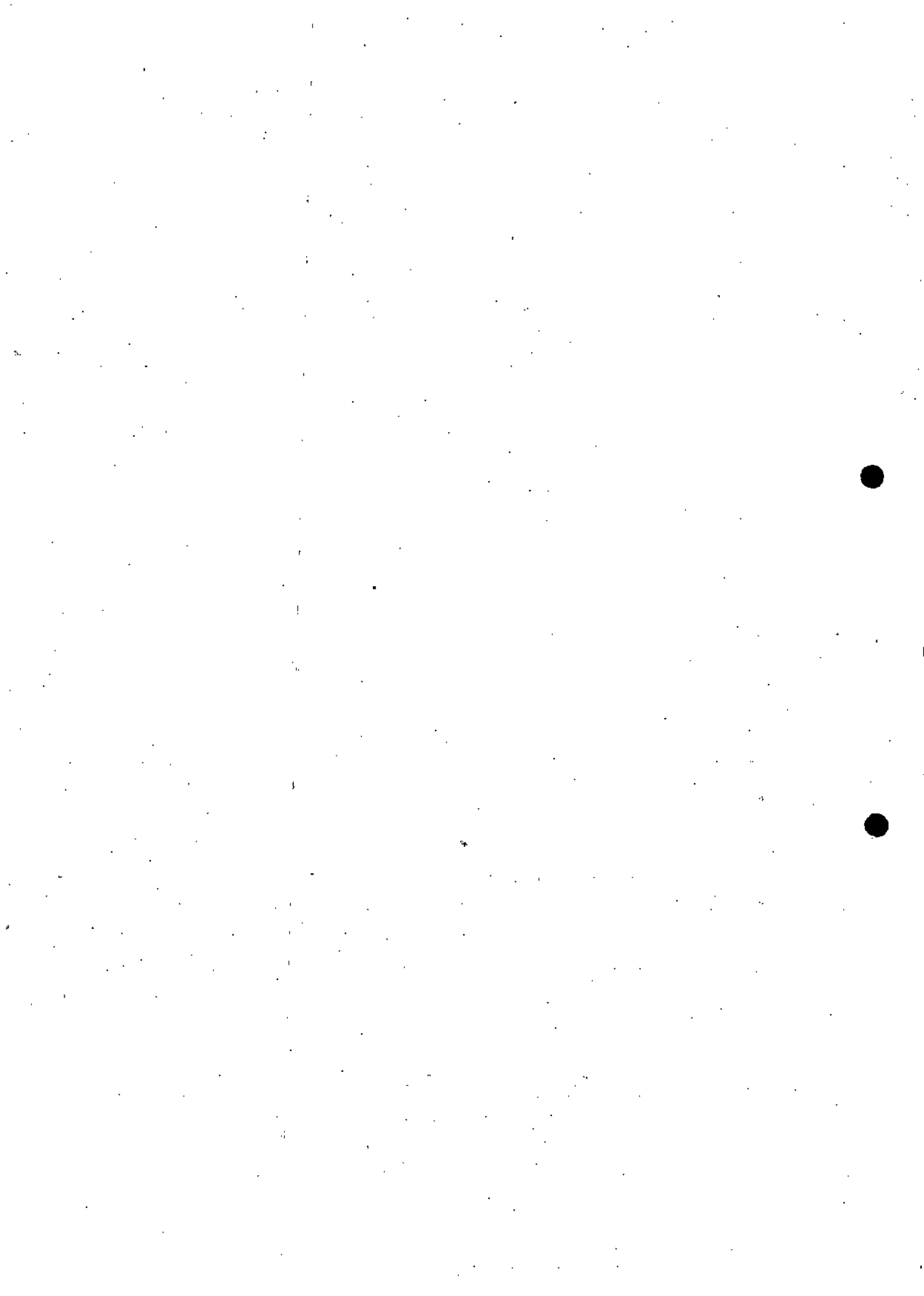


contínuo; e (4) censo instantâneo. Os censos serão realizados por pelo menos um ornitólogo com experiência, sempre do mesmo local ou do melhor lado da embarcação de acordo com condições de luz e vento no momento. Ao final de uma sequência de censo, será iniciada outra após intervalo de 10 minutos. O censo contínuo abrangerá as aves que durante um período fixo de tempo aparecem dentro de uma faixa de 300 m de largura, medida a partir do bordo da embarcação em ângulo reto com a rota do navio, excluindo as aves seguidoras. Aves seguidoras são aquelas que acompanham a embarcação durante a navegação, geralmente voando atrás do barco, e deverão ser contadas da popa. No censo instantâneo, o tempo de contagem será dividido em intervalos consecutivos de duração fixa. Ao início de cada intervalo serão contadas as aves presentes dentro do raio de 300 m entre o rumo do barco e a linha perpendicular a este, varrendo-se assim a quarta parte de um círculo. Os censos contínuos terão duração de 10 minutos e os censos instantâneos terão 10 intervalos consecutivos de 1 minuto.

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

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

Informações sobre áreas e padrões de forrageamento devem ser coletadas de duas espécies de aves marinhas por meio de rastreamento remoto, cujos transmissores deverão emitir sinais de rádio captados pelos satélites em órbita terrestre que estão sobre a área no momento em que o sinal é emitido (ARGOS, 1996). Os equipamentos



deverão pesar até 5 g, serem fixados no dorso das aves marinhas e, dependendo do modelo, recarregados por meio de um painel solar. Os dados devem ser obtidos sem a necessidade de recaptura dos organismos, através de um canal de transmissão de dados alugado junto a empresa especializada (Candia-Gallardo *et al.*, 2010).

Itinerário Fixo

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

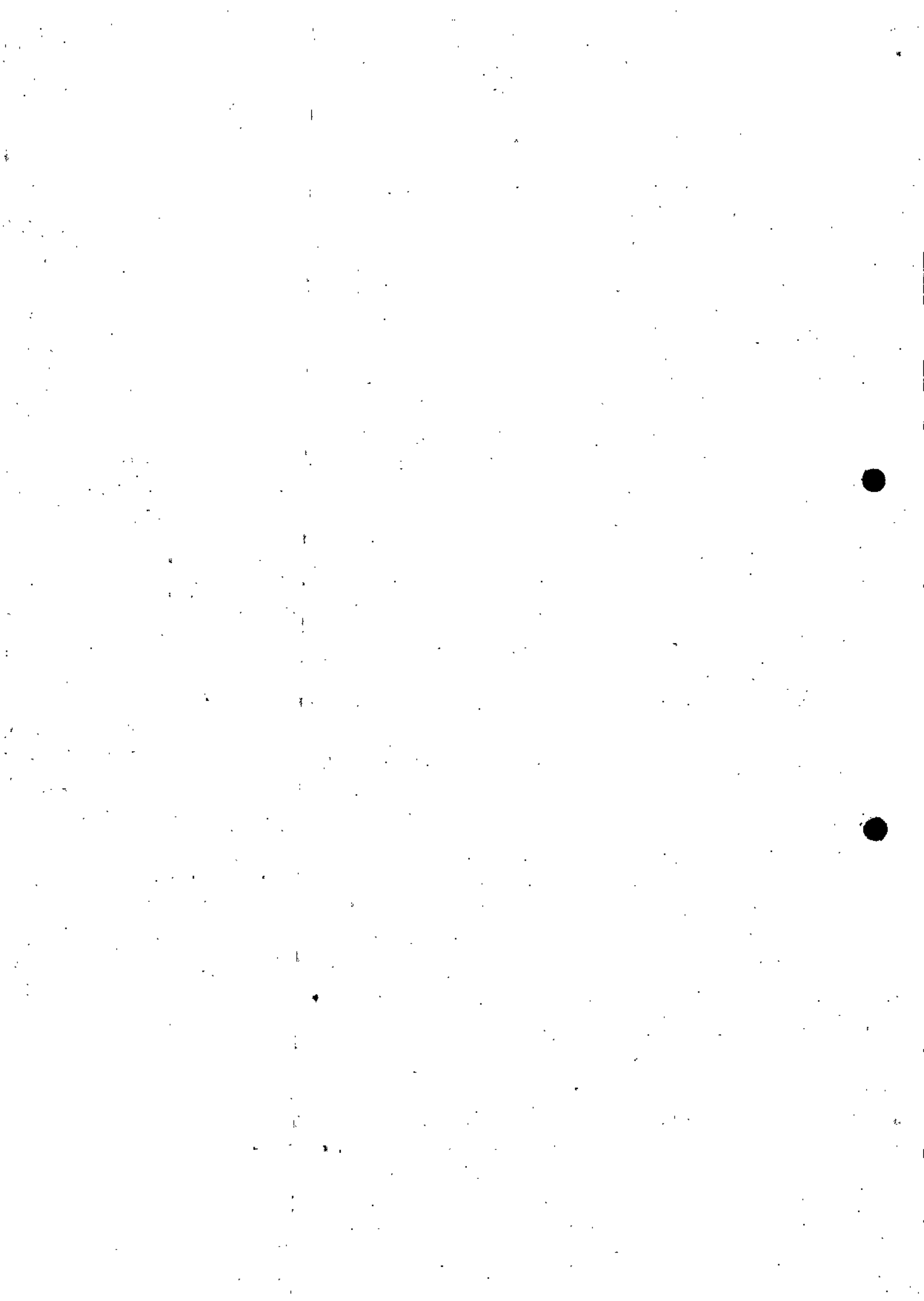
Para registrar a existência de indivíduos de interesse em bancos de areia, utilizados como dormitório e área de descanso, na margem da foz e no estuário, será utilizado o método de Contagem em Descanso (BRANCO *et al.*, 2010).

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

Bioacústica

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

Assim, dados acústicos e comportamentais serão coletados a partir de uma embarcação adequada para a atividade, onde serão realizadas gravações síncronas

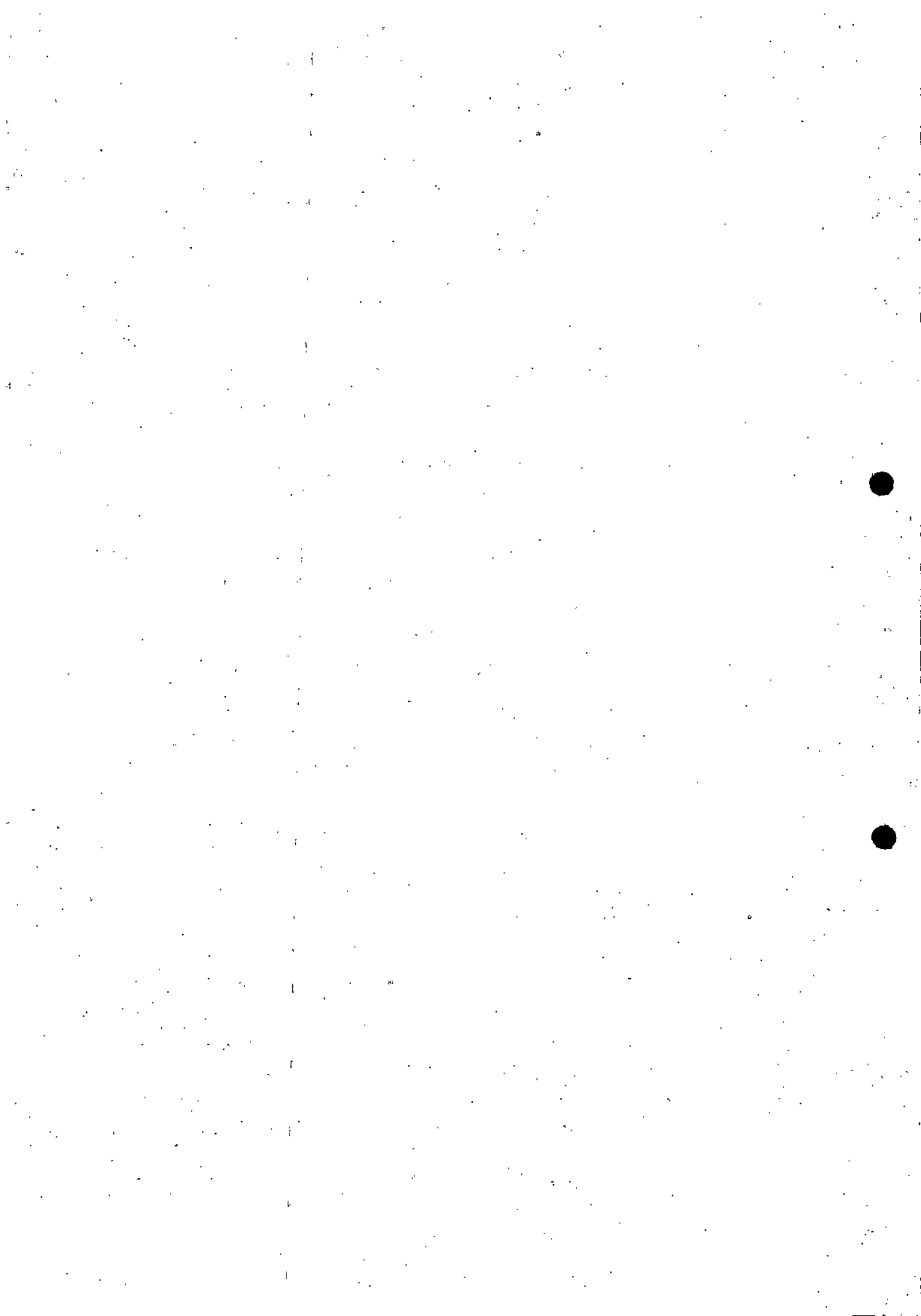


de vídeo e áudio e gravações de áudio independentes. Imagens serão gravadas a partir de uma câmera de vídeo portátil conectada a um hidrofone e um microfone. Gravações de sons independentes serão realizadas com hidrofone e um gravador de estado sólido portátil. Após a avistagem, a aproximação ao grupo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

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

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

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



à entrada de microfone de uma filmadora digital SONY DCR-SX40 protegida por uma caixa estanque, para que se possa fazer filmagens subaquáticas.

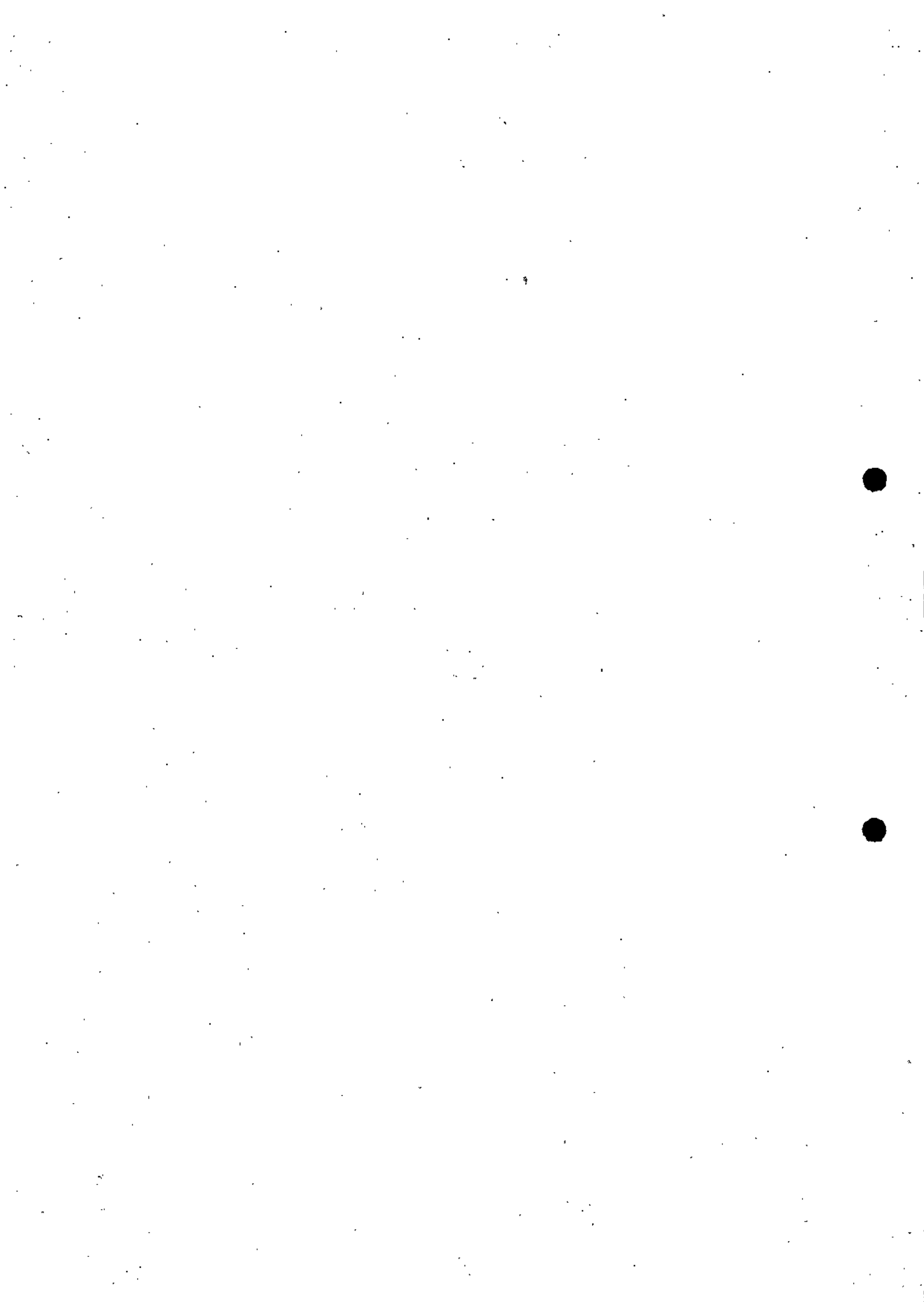
O indivíduo que emitir o sinal vocal deverá ter seu comportamento registrado pela câmera, além da sua vocalização (adaptado de DUDZINSKI *et al.*, 1995). Paralelamente, outro membro da equipe deverá registrar em planilha de campo dados ambientais, tomados a cada hora. Seguindo a técnica de amostragem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

As análises das emissões sonoras serão feitas utilizando o programa Raven Pro 1.3, o qual fornece o oscilograma e o sonograma, e do *software* Adobe Premier 7, que mostrará a gravação da imagem em tempo sincronizado com o oscilograma da trilha sonora gravada, procurando relacionar a vocalização emitida com o comportamento. As emissões sonoras serão classificadas inicialmente em cliques, sons pulsantes ou assovios. Os assovios serão classificados em tipos, conforme a similaridade de seus contornos.

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

Pontos fixos

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



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

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

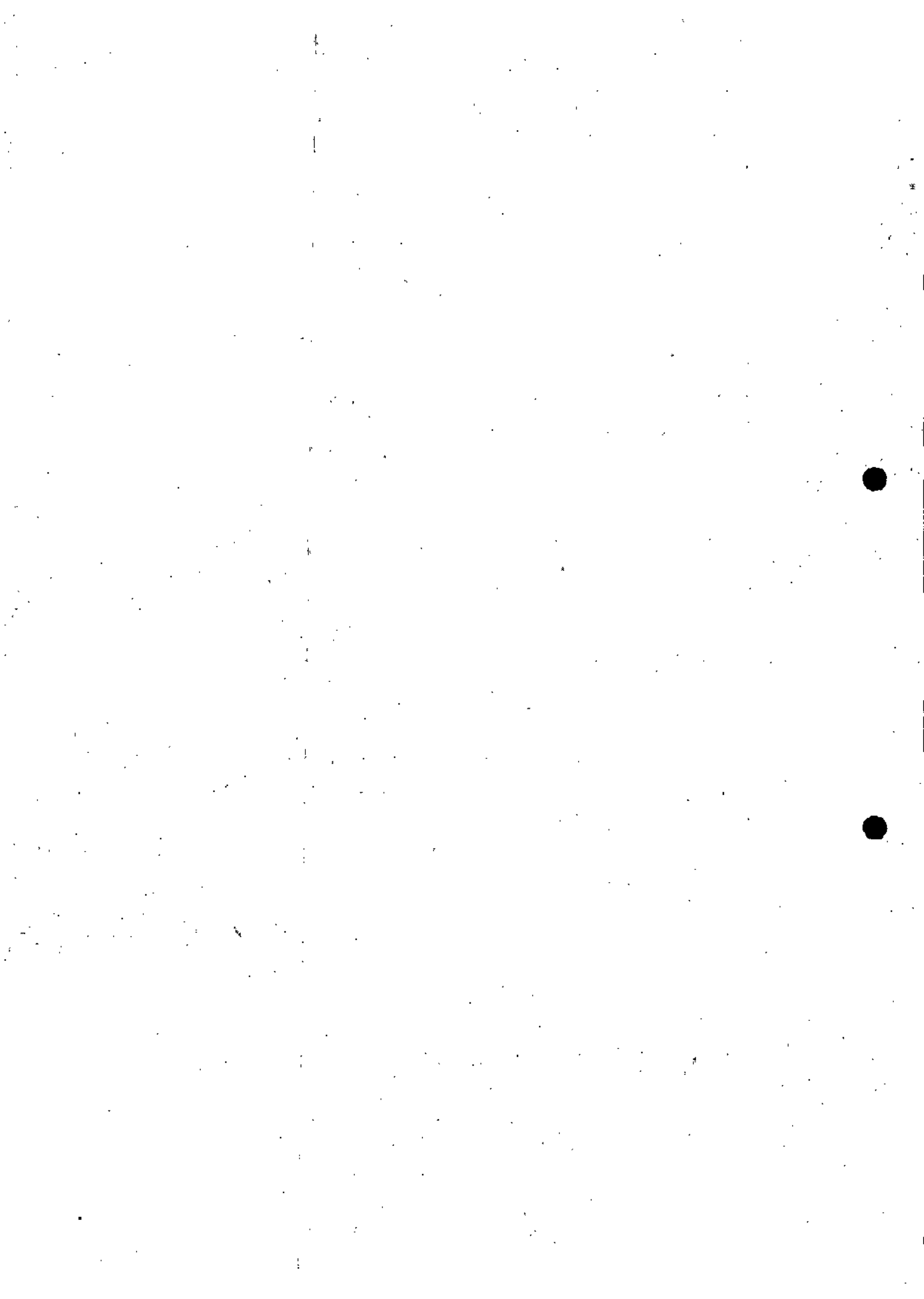
Durante este período serão realizadas observações naturalísticas dos comportamentos utilizando o método de amostragem *Ad Libitum* (LEHNER, 1997). Para as observações, deverão ser realizados os métodos "animal focal", quando o indivíduo é o foco das observações durante um determinado período, mas não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

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

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

Veículos aéreos não-tripulados (VANT ou drones)

Com o objetivo de se coletar registros (imagens e filmes) em diversos pontos do litoral do Espírito Santo utilizando os padrões metodológicos conhecidos de busca e



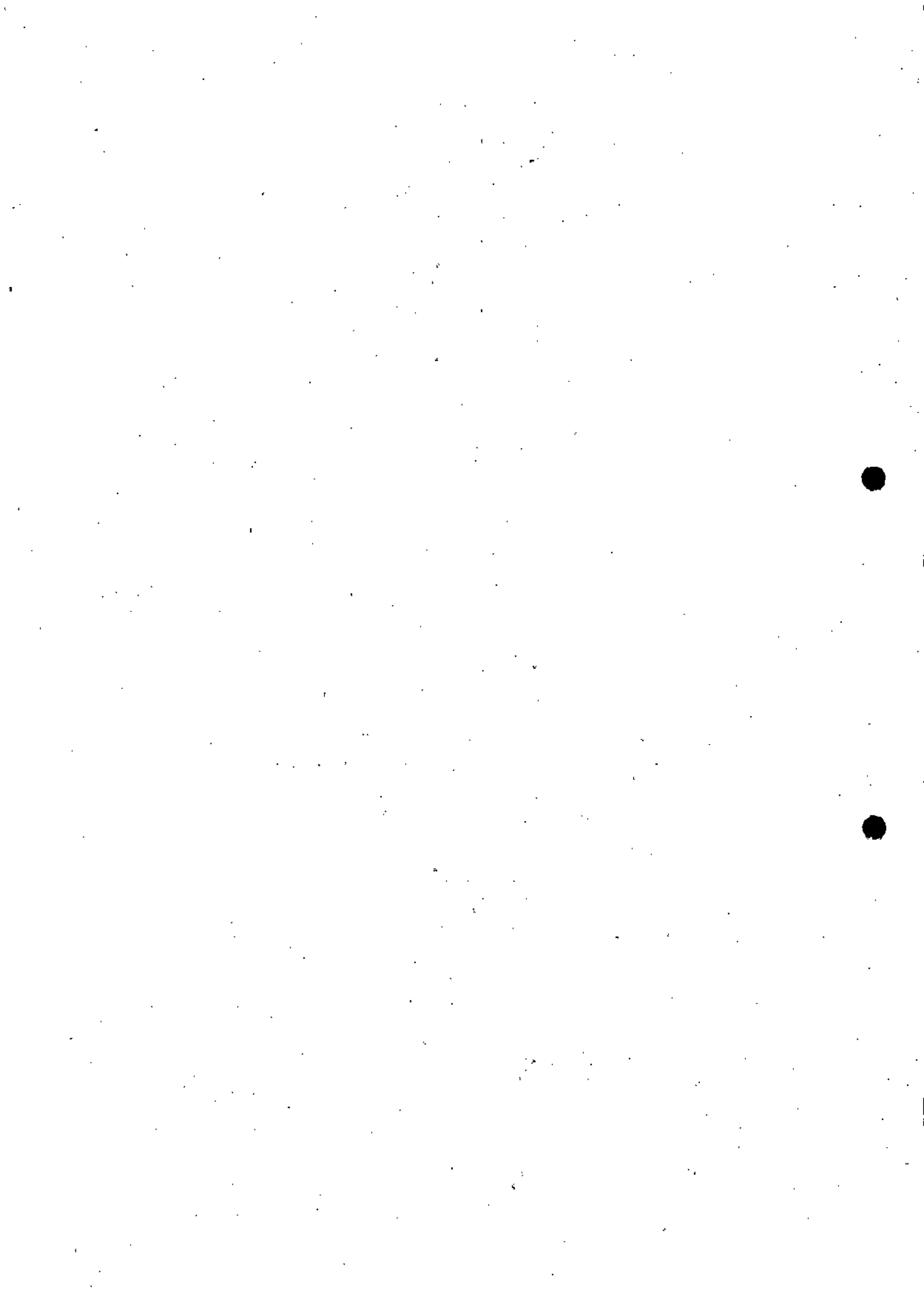
varredura (BEVAN *et al.*, 2016) de organismos foco deste estudo, serão utilizados veículos aéreos não tripulados (VANT ou drones). Segundo o Anexo 6, esta técnica trará informações sobre diversidade e abundância de indivíduos, tamanho, direção e velocidade de deslocamento, ritmo de mergulho, tamanho do grupo, número de juvenis e adultos, comportamentos de alimentação, deslocamento, interações intra e inter-específicas, dentre outros.

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

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

Se forem identificadas agregações ou a relação de determinada espécie com uma área, devem ser conduzidos o mapeamento e identificação dos microhabitats com o auxílio de um ROV (SMOLOWITZ *et al.*, 2015). Sugere-se que seja verificada a viabilidade do uso de um trenó equipado com câmeras subaquáticas rebocado por embarcação (veja ROOPER, 2008), visando otimização do custo e possibilidade de conjugar seu uso com outros estudos embarcados. Este mapeamento e identificação dos microhabitats é previsto para acontecer em campanhas semestrais, com duração de até 10 dias cada.

As informações georreferenciadas sobre registros de espécies e de micro-habitats, direções e velocidade de deslocamento dos organismos detectados devem ser compiladas em plataforma SIG (Sistema de Informações Geográficas) e submetidas a diversos tipos de algoritmos ecológicos de análise de distribuição espacial, bem como análises visuais e de interpolação e análises estatísticas tradicionais, de forma



a definir níveis de abundância das espécies observadas, padrões de associação com habitats e tendências de deslocamento e as variações temporais destes parâmetros.

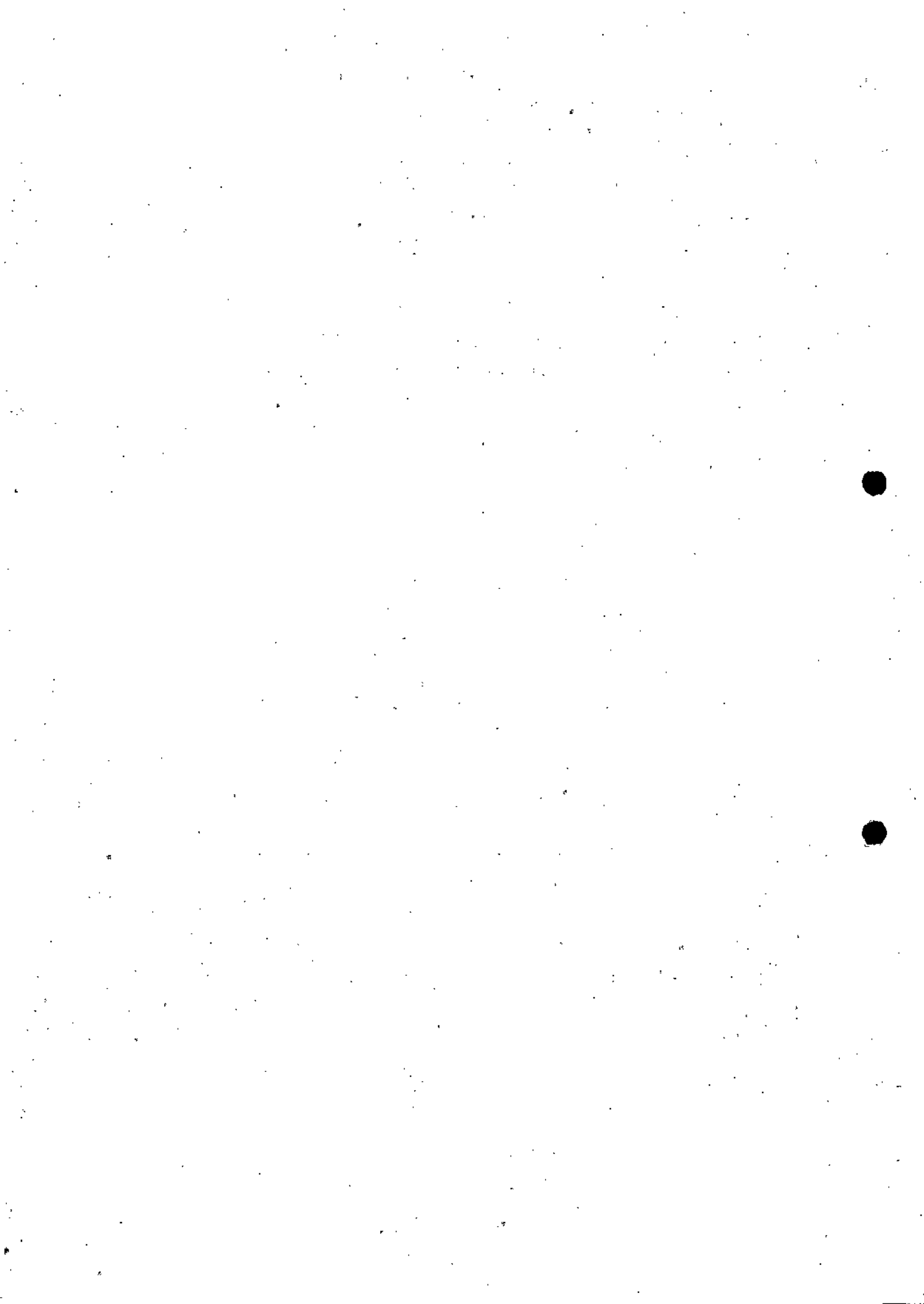
Aves

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

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

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

A correlação entre a distribuição e abundância dos cetáceos e aves e os parâmetros mencionados poderá ser testada por meio de métodos estatísticos tradicionais (e.g. análises de variância, co-variância e canônica), modelos lineares generalizados (GLM) ou modelos aditivos generalizados (GAM). A variação na composição e abundância (ou taxas de encontro) dos cetáceos e aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas) e por estações do ano deve ser testada por meio de análises de variância (ANOVA).



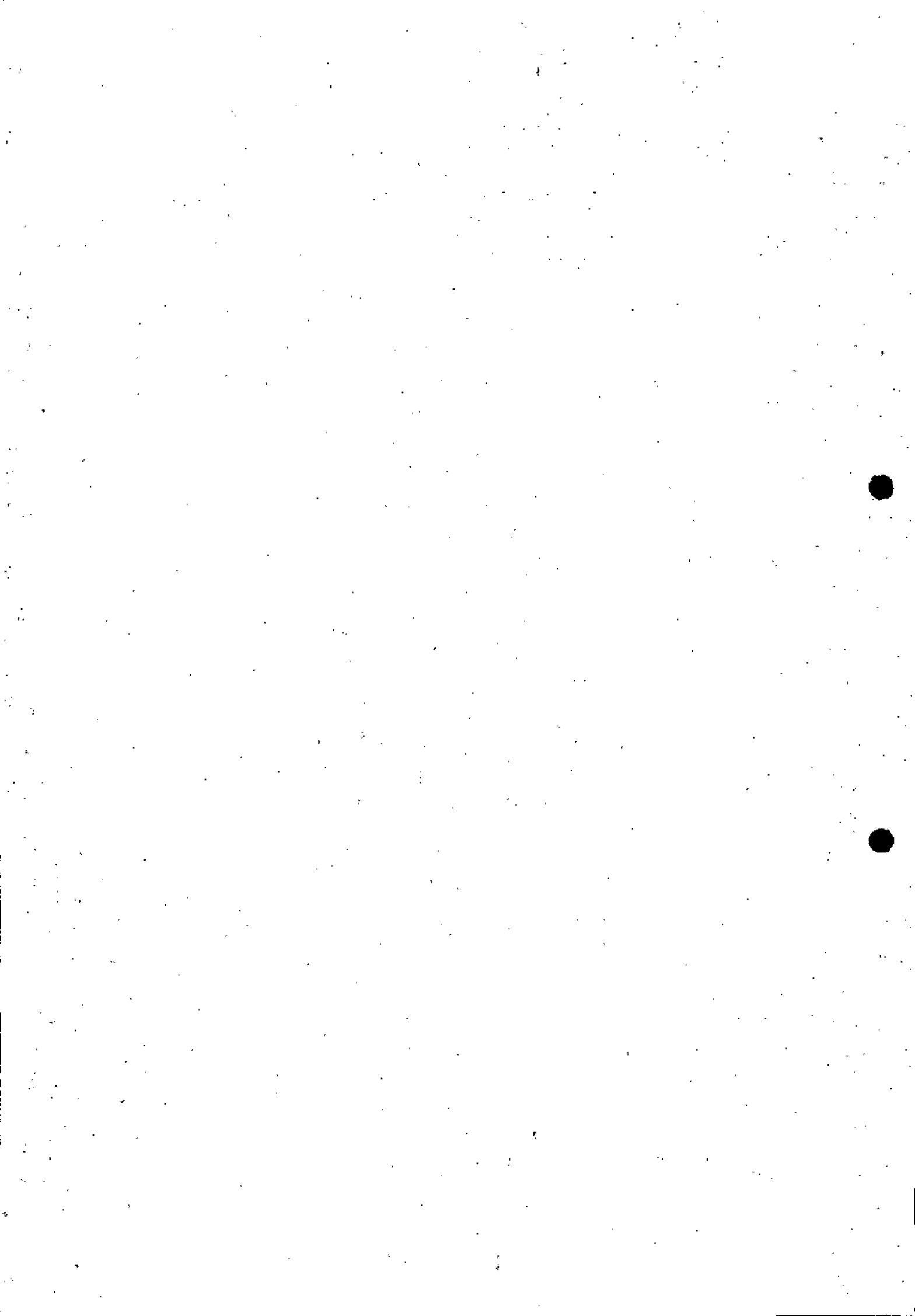
- Objetivos 3 e 4 (considerados em conjunto):
 - ✓ Objetivo 3 - Monitorar, por um período de cinco anos, os encalhes de todos os cetáceos, tartarugas e aves marinhas nas praias do litoral do ES e realizar necrópsias, quando for possível recolher os animais, para determinar uma possível *causa mortis*.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

Programa de Monitoramento de Praias

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

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

Dessa forma, como as equipes da PETROBRAS estarão diariamente no campo registrando tais ocorrências, está sendo firmada parceria para que os registros sejam compartilhados, assim como o atendimento e recolhimento de amostras, possibilitando que ambos os projetos possam executar suas atividades de forma satisfatória. A Fundação Renova já contratou a Fundação Pró-Tamar para realizar o monitoramento de quelônios descrito no Objetivo 10 deste Anexo 6, o que irá auxiliar na notificação e



recolhimento de animais encalhados nos 156 km de praias no entorno da foz do rio Doce.

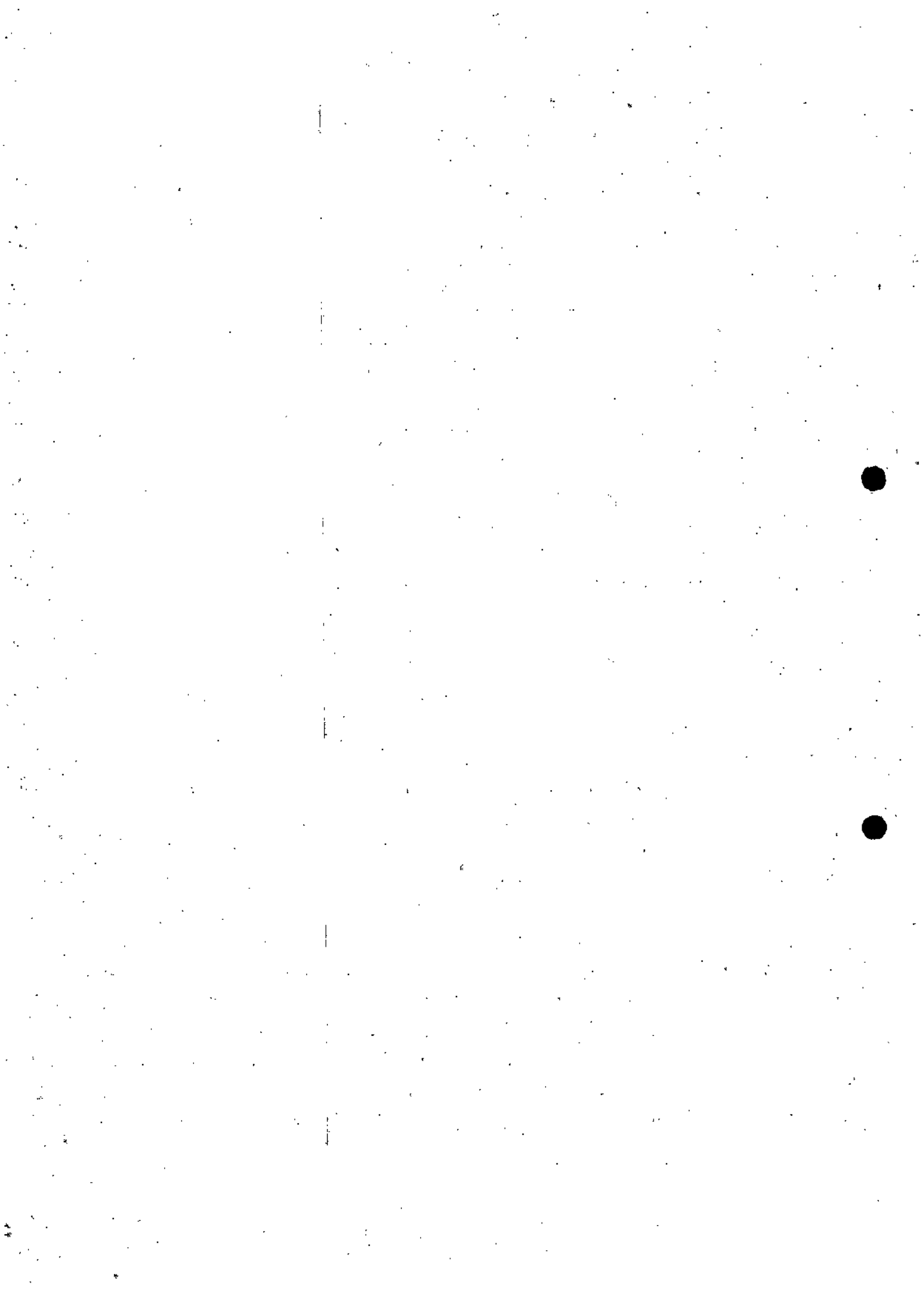
Assim, todas as aves, quelônios e mamíferos encontrados mortos e que estiverem em condições de serem analisadas, serão encaminhados às equipes do PMP para exames necroscópicos na tentativa de se identificar a causa mortis e coleta das amostras descritas no Anexo 1. Já os animais encontrados vivos devem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

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

Aves

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

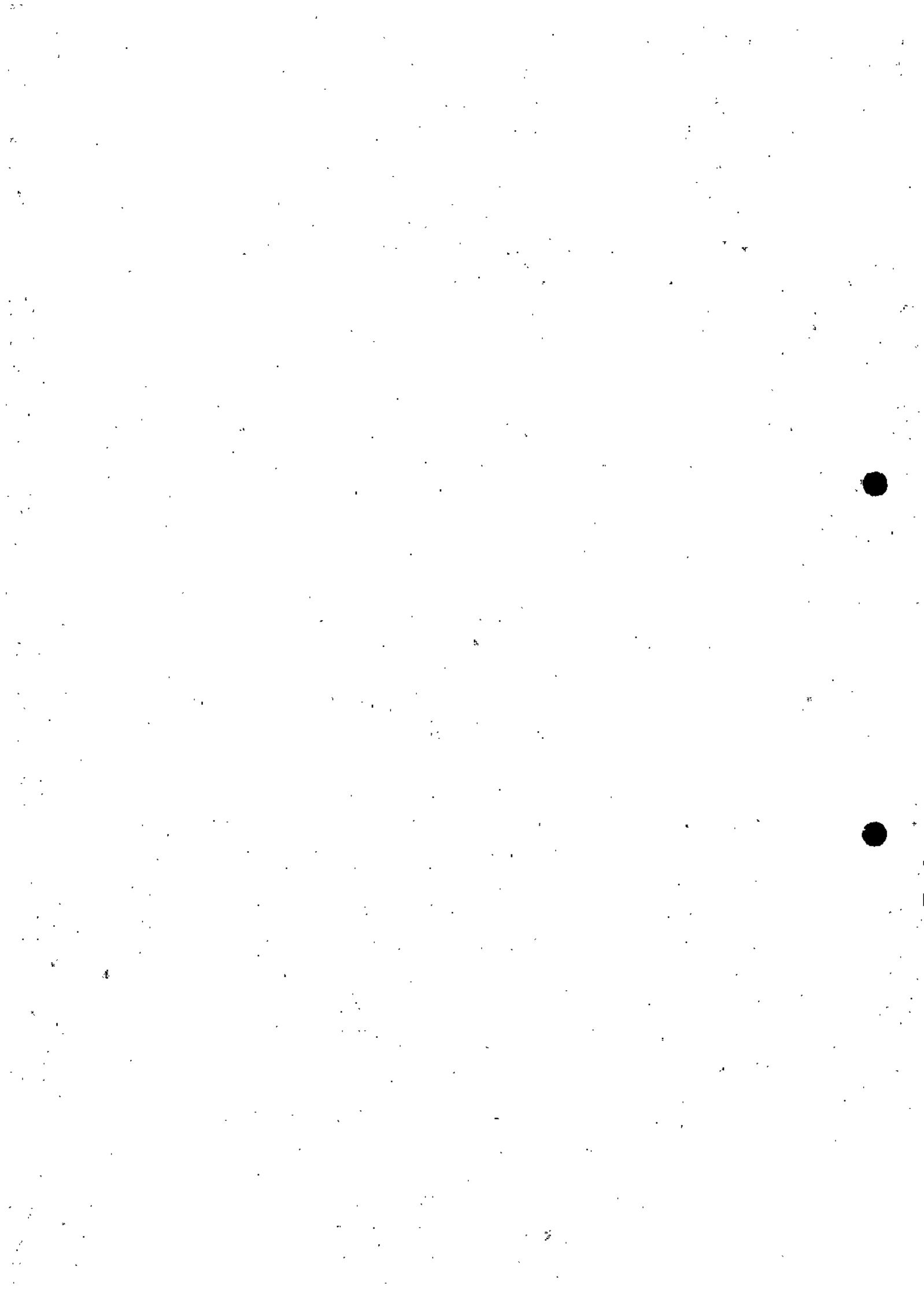
A análise das amostras de aves arribadas na região serão subsídio para elaboração de base de dados de avaliação sanitária, parâmetros hematológicos, bioquímicos e microbiológicos das espécies de aves marinhas biomonitoras da condição ambiental e sua evolução. Esta avaliação epidemiológica será essencial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



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

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

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



prevalência de doenças/patógenos de aves por região (perto vs. longe de costa/ilhas), por estações do ano, deverá ser verificada através de análises de variância (ANOVA).

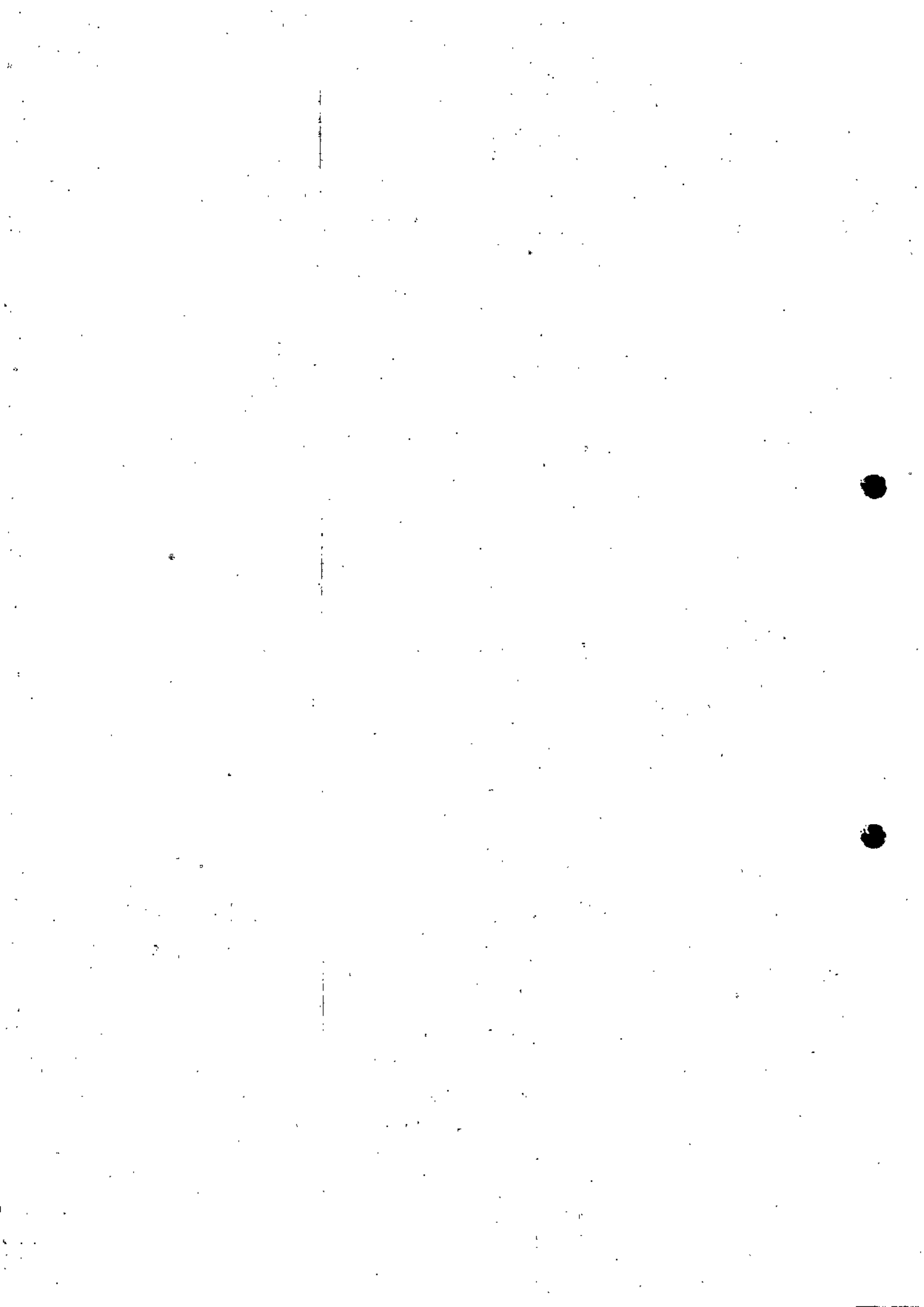
Cetáceos

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

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

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

As amostras de sangue e suabes deverão ser testadas quanto à presença de agentes infecciosos e parasitários. Para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, deverá ser realizado o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY & DESMONTS, 1987) utilizando amostras de soro. A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* deverá ser feita com o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) devido ao fato



deste exame não necessitar de conjugado específico para a espécie animal. O título de 1:20 deverá ser considerado indicativo para uma prévia infecção por *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2003).

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

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

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

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

O armazenamento dos tecidos e posteriores análises genéticas devem seguir as especificações apresentadas no Anexo 6. Este Anexo define a realização de análise



das sequências mitocondriais, o cálculo dos componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações. Serão construídas as redes de haplótipos com cálculos de Median Joining no programa Network e feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Para as análises dos microssatélites, os *loci* deverão ser identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

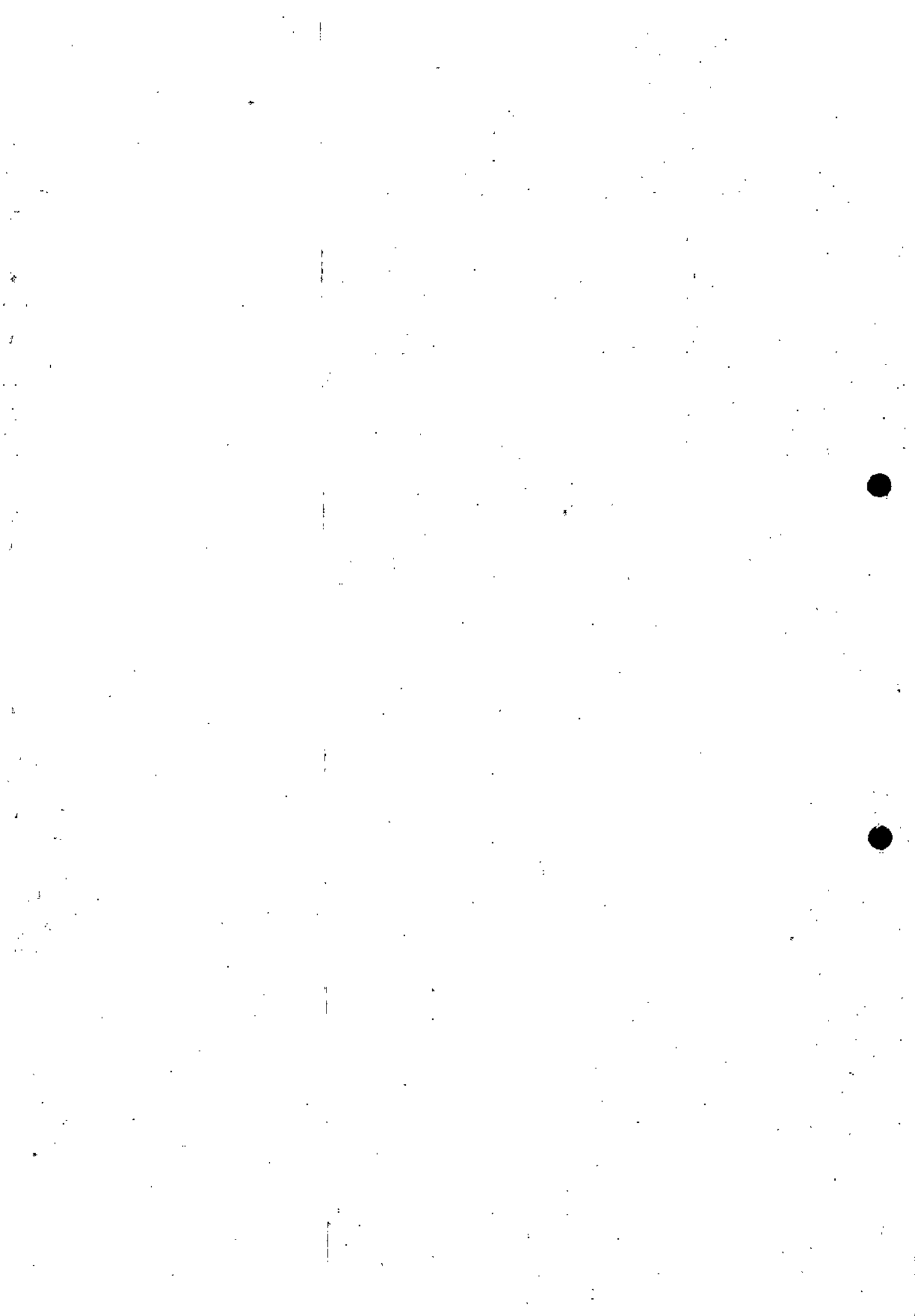
A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o *software* Cervus v.3.0.3 (KALINOWSKI *et al.*, 2007). Os genótipos dos indivíduos avaliados deverão ser comparados para os *loci* de microssatélites com o programa Mstools v. 3.1 (PARK, 2001) para se verificar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

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

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

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

Para determinar a provável estrutura populacional deverá ser realizada uma análise de *cluster* bayesiana para se estimar o número de populações mais prováveis (K) a



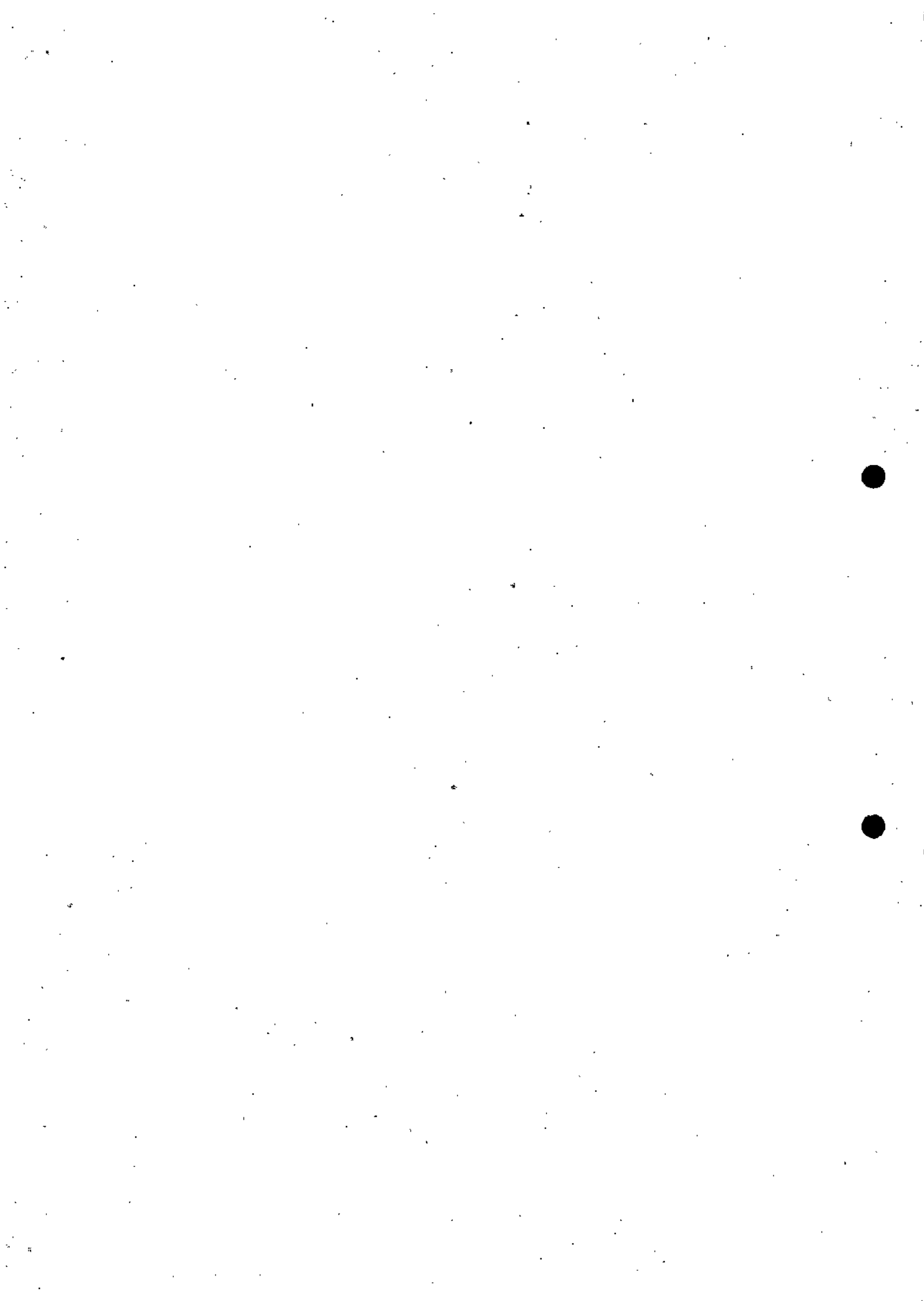
partir dos dados dos genótipos dos microssatélites e dos locais de coleta, utilizando o *software* Structure v.2.3.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000).

Após a alocação dos indivíduos em cada *cluster*, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também serão calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST) e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Valores de P deverão ser considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

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

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

Após recolhidas as amostras de tecidos, o material de cetáceos, quelônios e aves será enviado para um laboratório especializado em análises de contaminantes. As

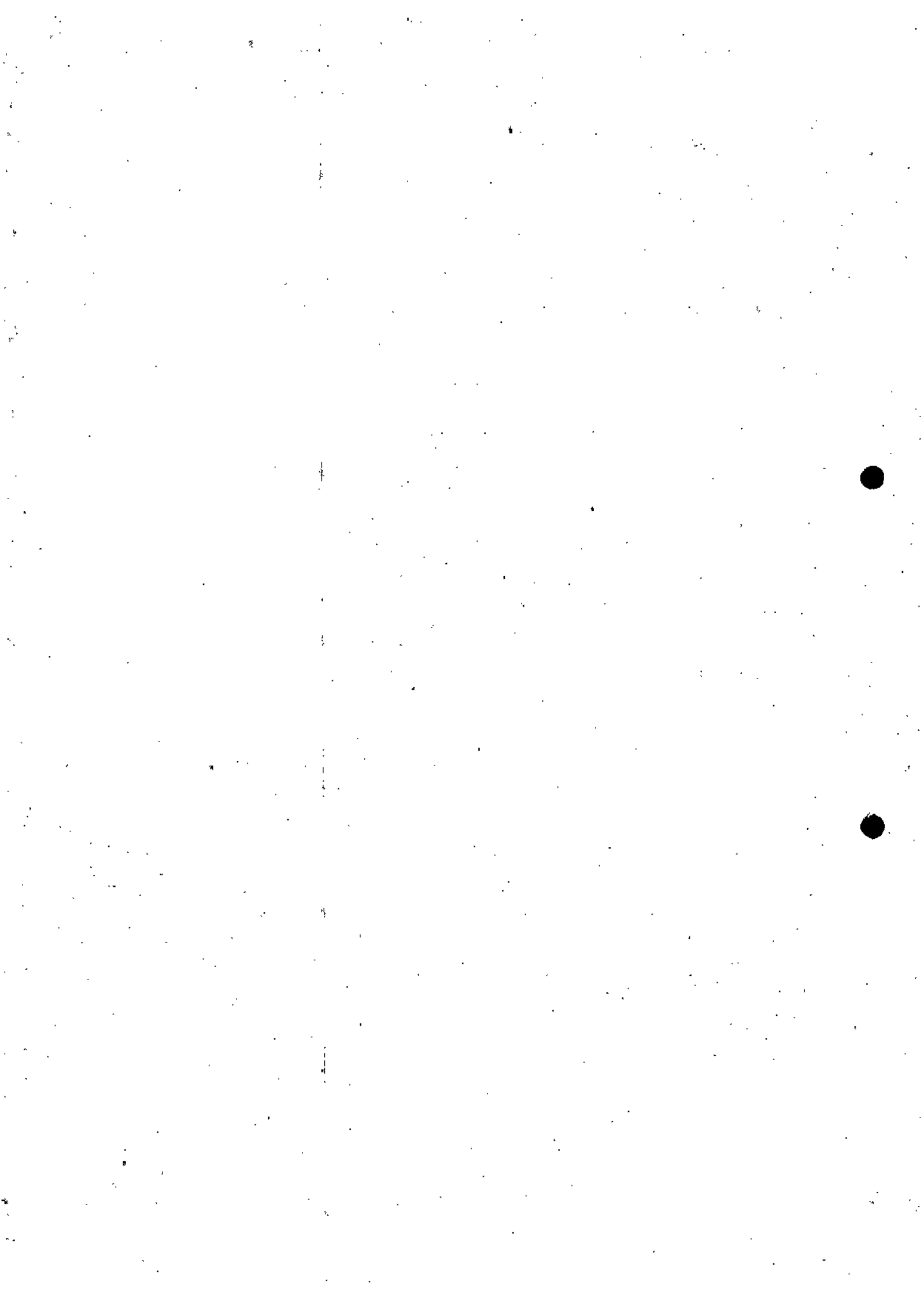


metodologias para análise deste material já foram descritas no Anexo 1 deste documento.

Além das metodologias descritas no Anexo 6 para as análises de mercúrio total (HgT), elementos traço, organoclorados, organobromados (para estes dois últimos, apresentou-se sugestão de retirada do escopo devido à dissociação com o perfil de risco do rejeito e histórico de contaminação) e HPAs, serão realizadas coletas sanguíneas de cetáceos que encalharem vivos para a análise de contaminantes. As coletas deverão ser realizadas em tubos contendo heparina e EDTA, sendo posteriormente encaminhados para o laboratório. As amostras de soro sanguíneo deverão ser estudadas. A quantificação de Mercúrio (Hg) e Selênio (Se) deverá ser obtida através do Método Calorimétrico - Espectrometria de Absorção Atômica. Para obtenção da concentração sérica de Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Cobalto (Co), Molibdênio (Mo) e Chumbo (Pb) a técnica adotada deverá ser a Espectrometria de Emissão Atômica (ICP OES). Quanto a determinação de Cálcio (Ca), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Potássio (K) e Cloro (Cl) deverá ser feita pelo analisador automatizado para testes bioquímicos e imunoquímicos (Labmax® 240) seguindo as recomendações sugerida pelo fabricante.

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

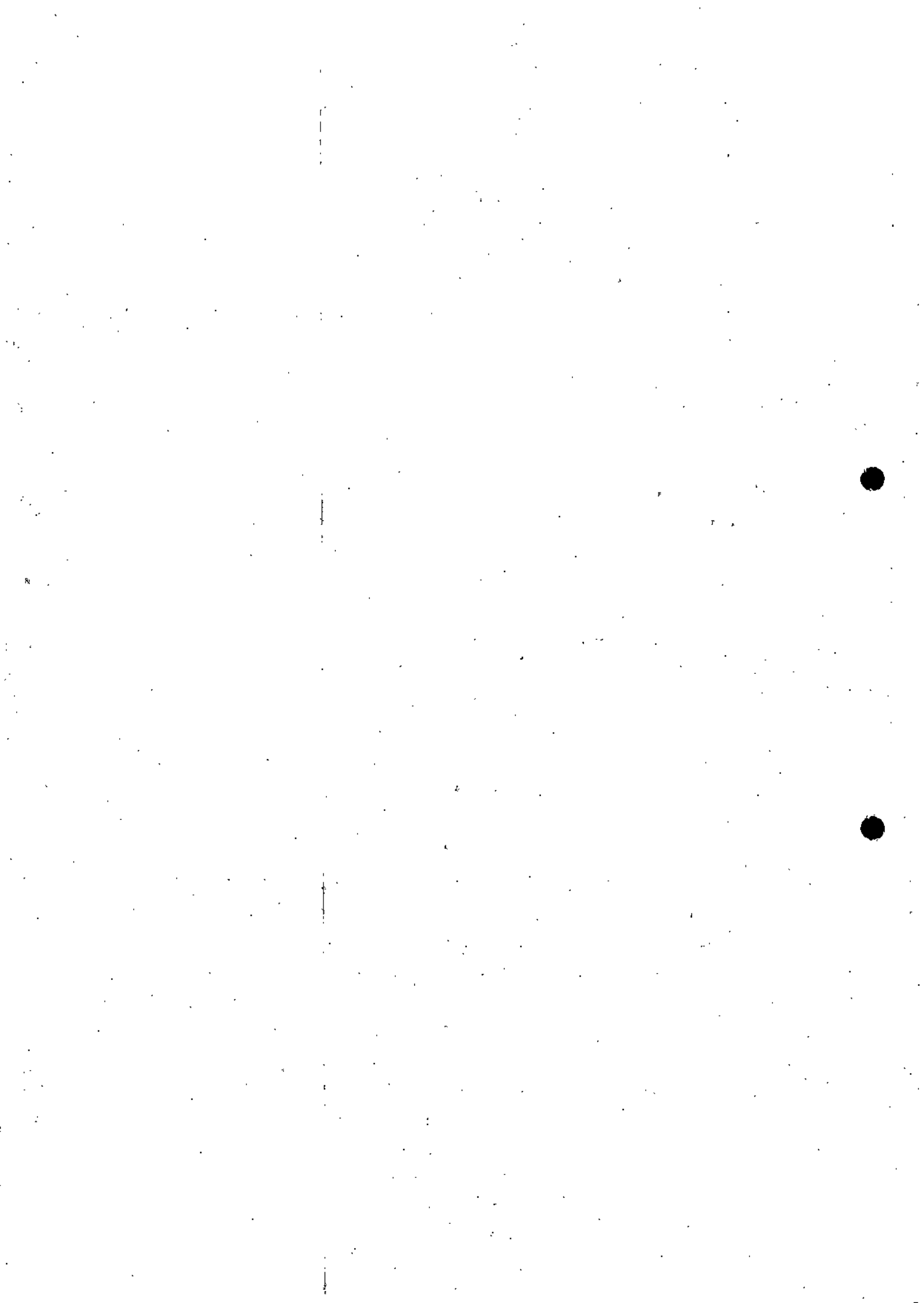
A medição da atividade da acetilcolinesterase deverá ser avaliada em amostras de sangue de animais segundo o protocolo proposto por Wilson & Henderson (2007). As



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

Nas aves marinhas deverão ser analisados os metais/elementos-traço Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As, de amostras de sangue e penas das aves vivas (debilitadas encontradas nas praias, capturadas a bordo das embarcações ou nas ilhas onde se reproduzem). Das aves mortas nas praias da região deverão ser realizadas as mesmas análises de duas espécies costeiras, uma residente, o atobá-marrom (*S. leucogaster*) e o migratório *T. chlororhynchos*. Destas amostras deverão ser realizadas análises de penas, fígado, músculo, rim e ossos. Este material deverá ser congelado para posterior análise. As análises das concentrações destes elementos deverão ser realizadas no mesmo laboratório onde serão realizadas as análises de metais em água, zooplâncton, invertebrados e peixes na região. Estes últimos grupos da fauna incluem potenciais presas das aves e, desta forma, ao usar-se o mesmo procedimento serão possíveis comparações entre os grupos, para um melhor entendimento da dinâmica dos elementos contaminantes na região.

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



traços: proteína de peixe DORM-4 (NRCC) e tecido de mexilhão ERM-CE278 (European Reference Material). Amostras destes materiais de referência certificados deverão ser tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico coletado.

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

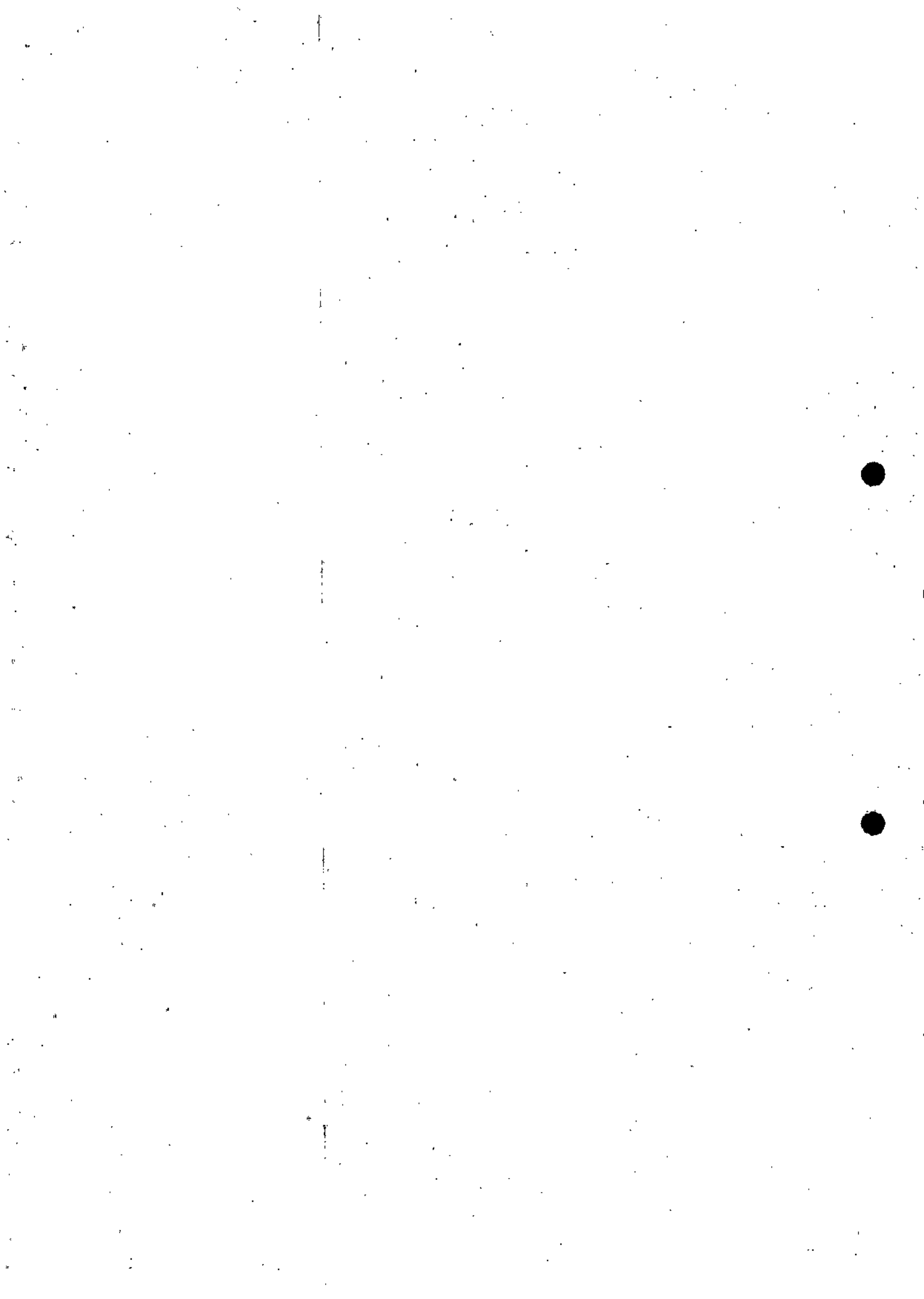
Para a análise dos isótopos estáveis $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, deverão ser retiradas alíquotas de músculo dos cetáceos e das suas presas preferenciais na costa do Espírito Santo. Em aves serão coletados músculos das aves mortas nas praias e sangue das aves vivas.

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

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

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

A determinação da idade dos odontocetos será realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinedo & Hohn (2000). Para isso, dois dentes de cada indivíduo serão colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação. Após essa etapa, deverão ser realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, de cerca de 25 micrômetros em um micrótomo de



serão realizadas e avaliados vestígios de aparato de pesca nos animais encontrados mortos.

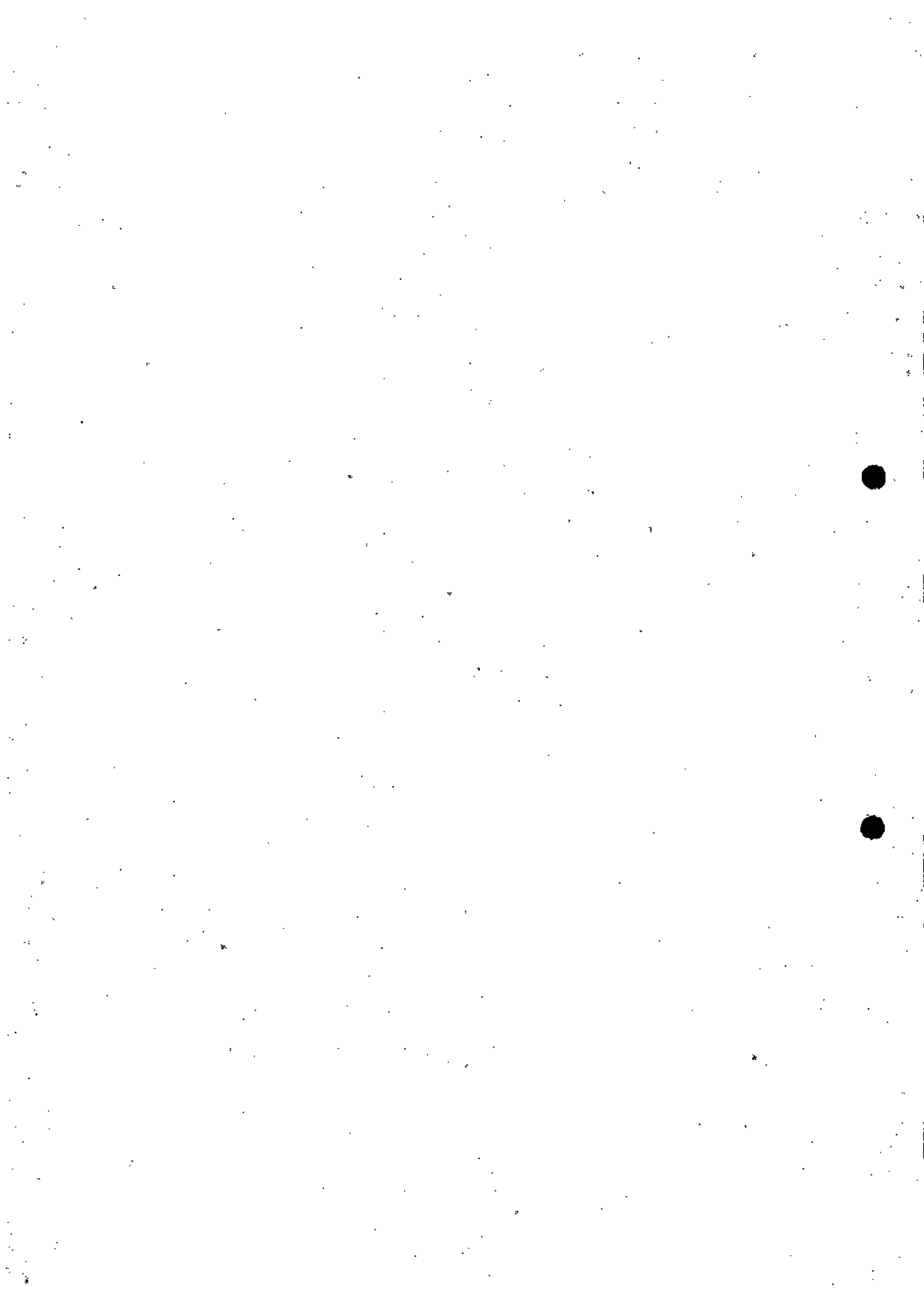
Serão escolhidos seis pontos de desembarque em comunidades pesqueiras. Em um primeiro momento, a equipe irá percorrer toda a área de estudo para reconhecimento e contatos com as associações e colônias de pesca, apresentando-se e fazendo um levantamento preliminar, com base nas informações das colônias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

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

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

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

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



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

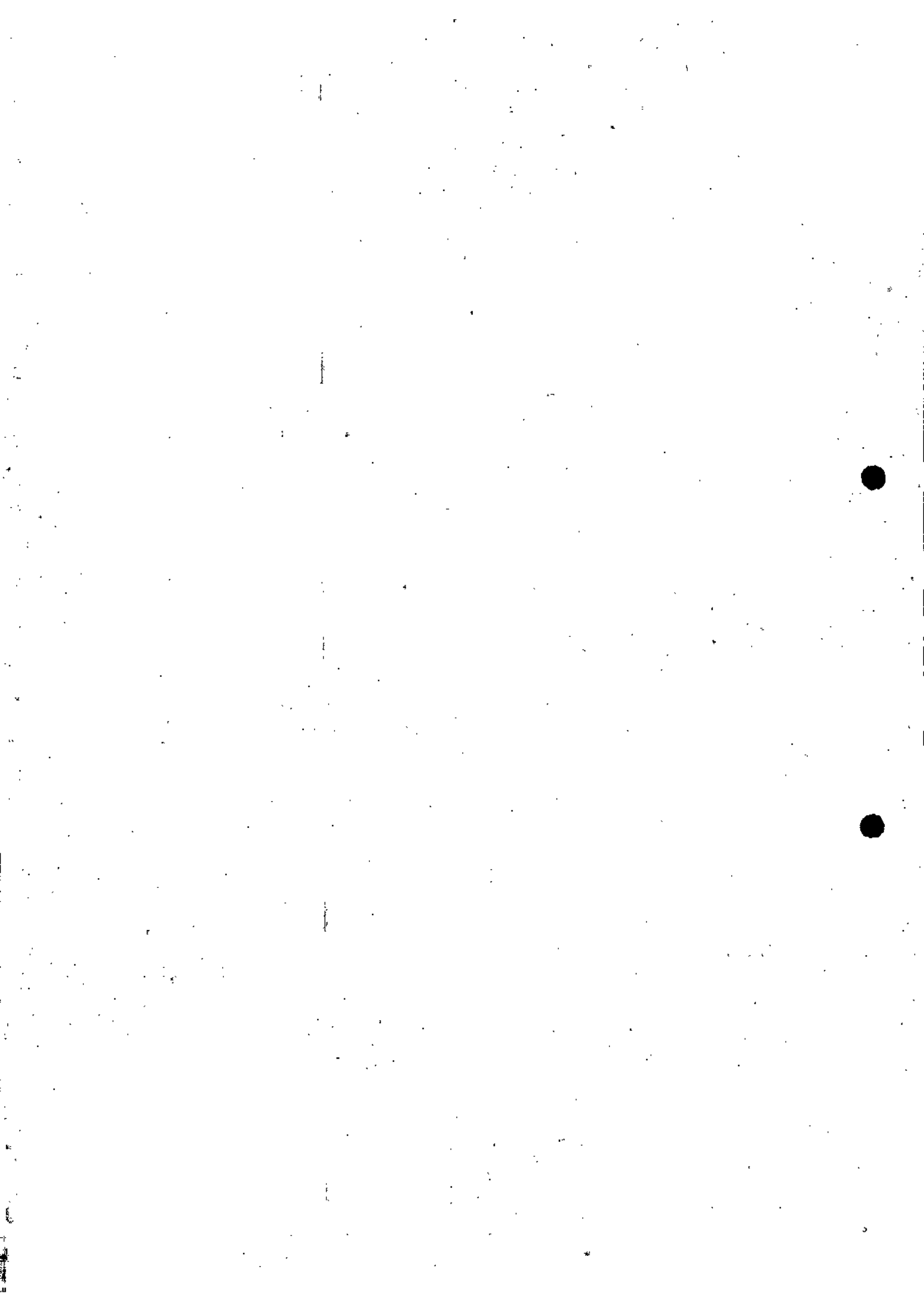
Após os quatro primeiros anos de projeto deverão ser realizados acompanhamentos para se identificar possíveis mudanças a médio e longo prazos.

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

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

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

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



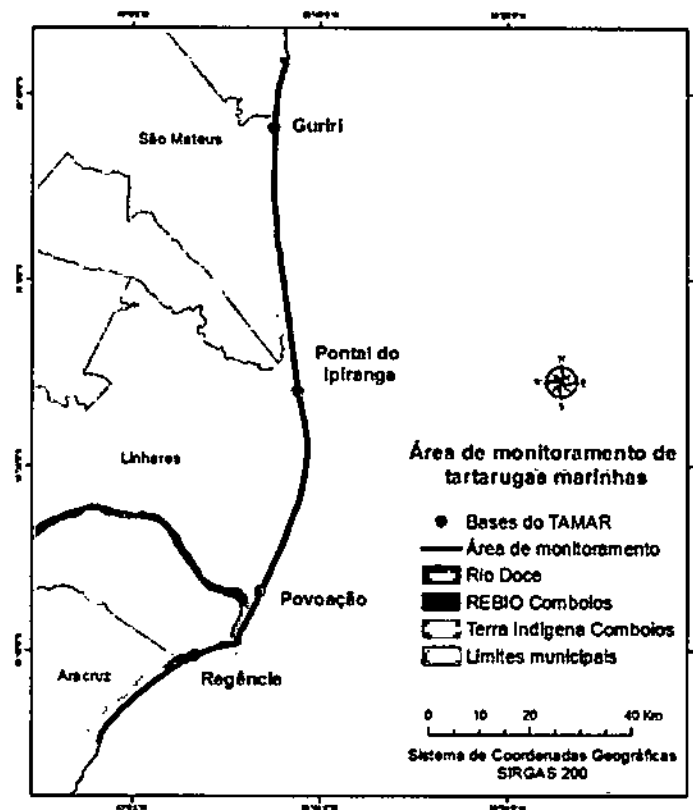
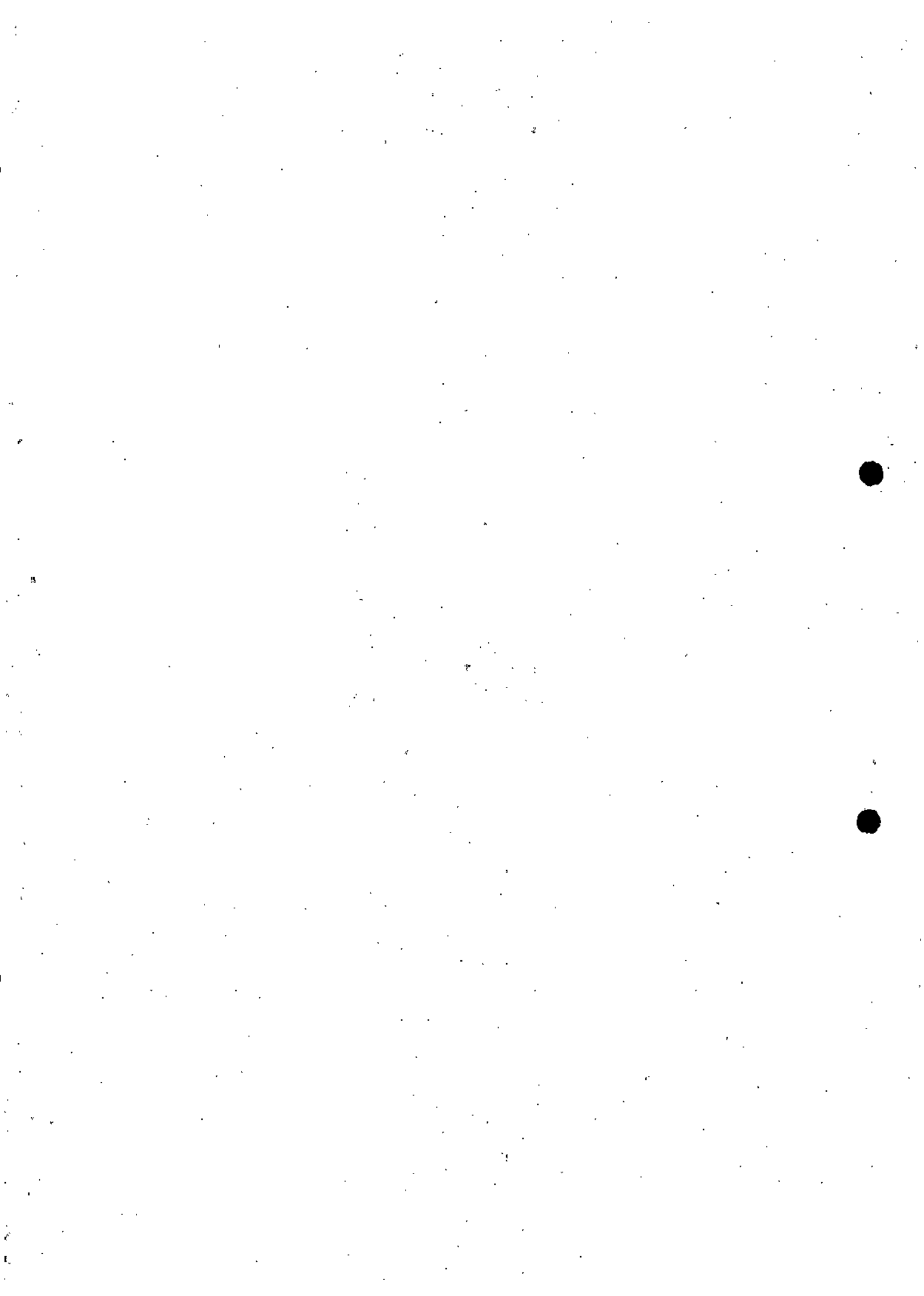


Figura 1 - Área de estudo de biologia reprodutiva de quelônios marinhos (monitoramento dos ninhos e das fêmeas). Fonte: Plano de Trabalho da Fundação Pró-Tamar.

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

A execução das atividades previstas nesta proposta irá mobilizar mão-de-obra local, de pescadores e moradores tradicionais da costa, para detecção e monitoramento das fêmeas, ninhos e filhotes, levando em conta o conhecimento tradicional. Será supervisionado por técnicos e estagiários, de forma que possibilite os estudos de distribuição espacial e temporal dos ninhos, sua proteção, identificação das espécies e avaliação do sucesso reprodutivo, entre outros.

Distribuição dos ninhos e sucesso reprodutivo dos quelônios



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

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

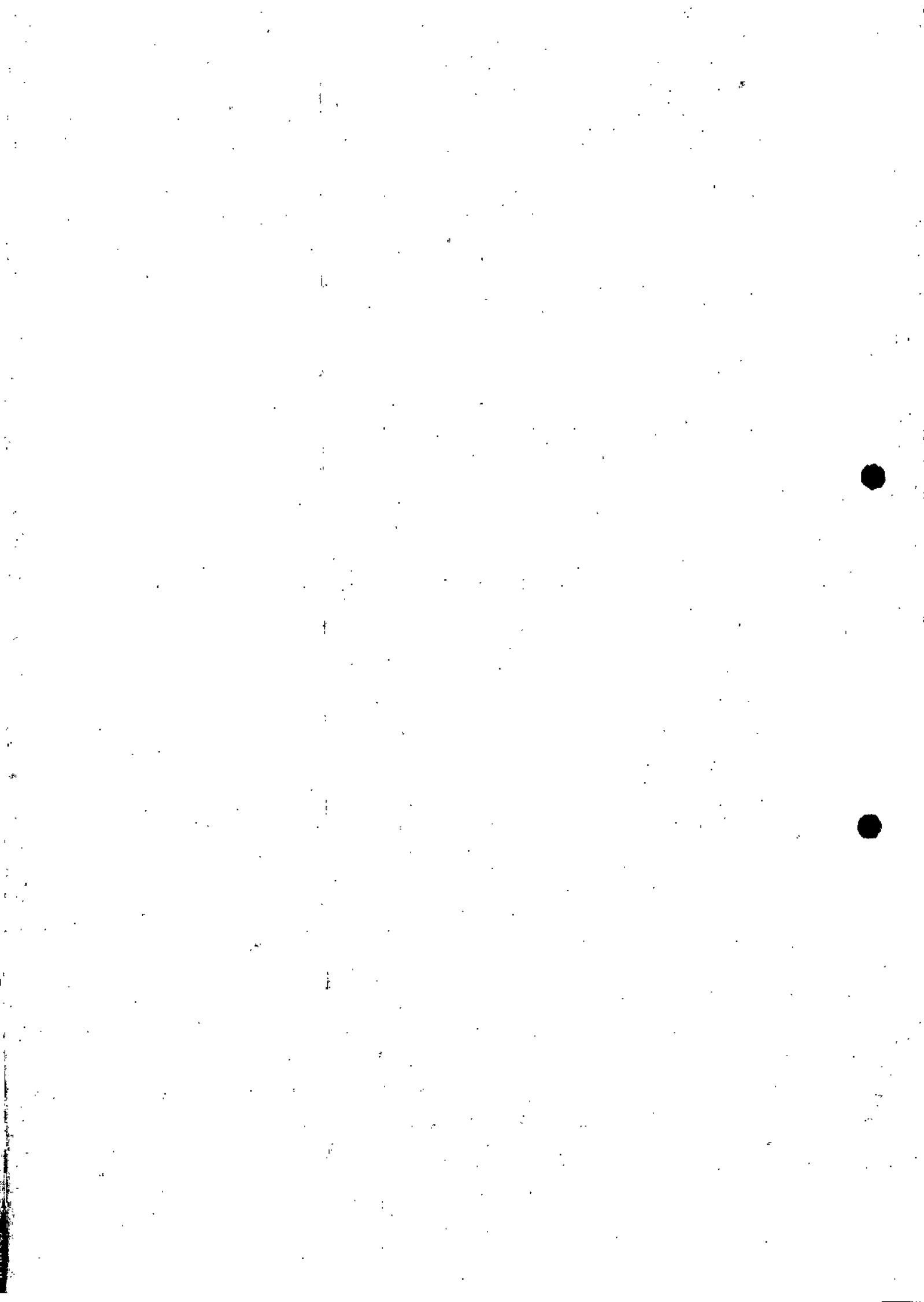
Todos os ninhos serão monitorados até sua eclosão, que varia entre 50 e 70 dias, a fim de garantir os dados reprodutivos. Após eclosão, o ninho será aberto e outros dados coletados, como espécie, número de filhotes nascidos, natimortos, ovos inviáveis e data de eclosão.

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

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

Avaliação do comportamento reprodutivo dos quelônios

Este estudo requer o monitoramento noturno das praias para flagrar as fêmeas em processo de desova. Quando encontradas, as fêmeas serão marcadas com anilhas metálicas, ou, se já existentes, será registrado o número da marca. Outros dados



também serão coletados, conforme ficha padrão do Centro Tamar, com as informações adicionais necessárias.

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

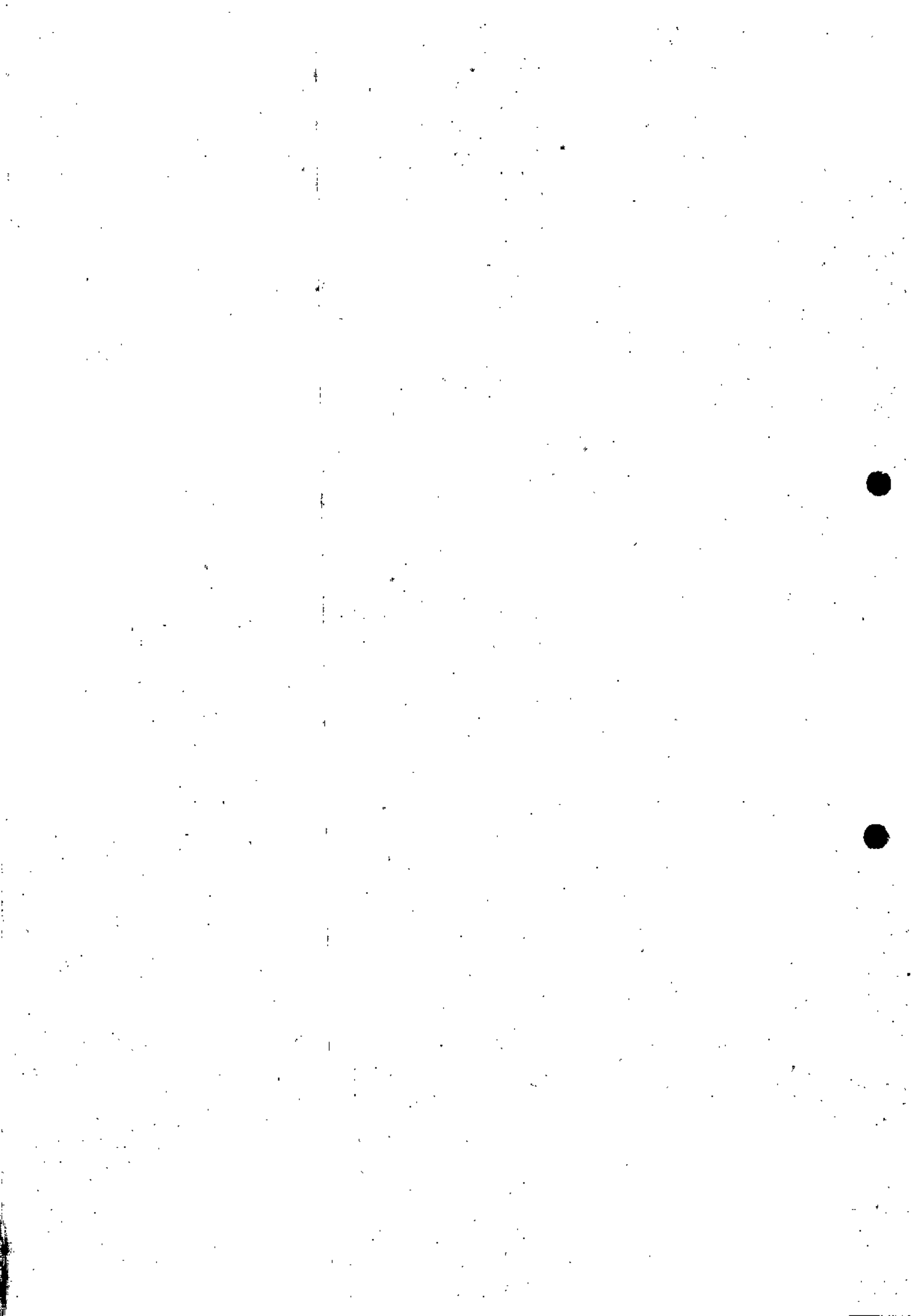
As informações buscadas deverão estabelecer o período e deslocamento internidal, retornos interanuais e locais de preferência para desovas, com acompanhamento de longo prazo das fêmeas. O flagrante da fêmea deverá permitir a coleta de tecido e/ou de sangue para os estudos genéticos e análise de contaminantes.

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

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

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

A área de alimentação a ser considerada deve incluir, no mínimo, a zona de amortecimento da APA Costa das Algas a partir da foz do Rio Piraquê-açu. Para fins de comparação, o monitoramento deve contemplar a região do banco dos Abrolhos no entorno da ilha de Coroa Vermelha, em Nova Viçosa - BA.

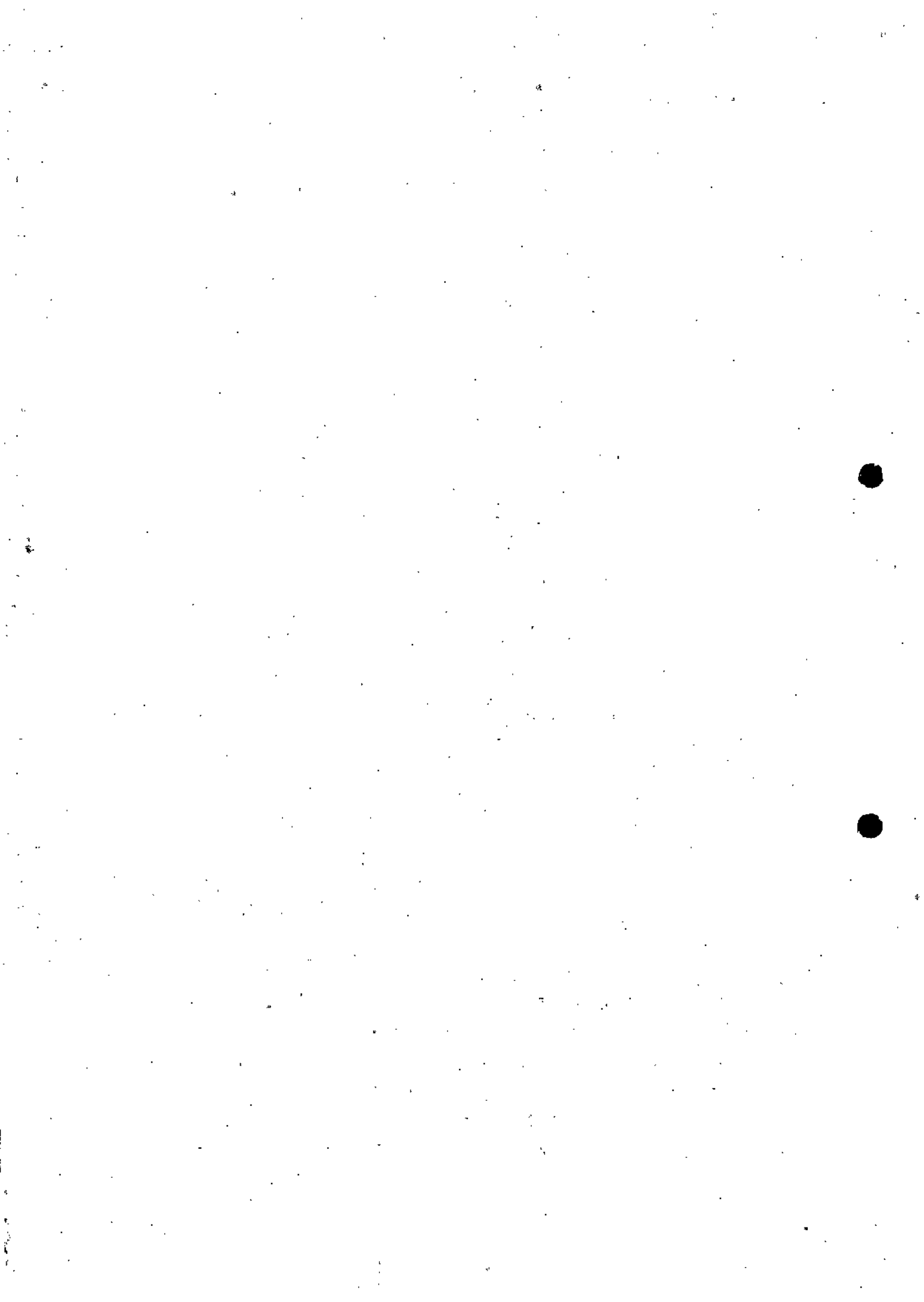


O monitoramento da fase reprodutiva deve ser diário ao longo de toda a temporada reprodutiva para amostragem de ovos, filhotes e fêmeas adultas, durando pelo menos cinco temporadas reprodutivas completas ou até quando persistir o efeito dos rejeitos sobre o ambiente marinho. O monitoramento de juvenis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

O estudo deverá avaliar as seguintes questões:

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

A avaliação deve ser conduzida por meio de métodos minimamente invasivos, utilizando amostras sanguíneas, ovos e filhotes neonatos vivos ou natimortos. Para a obtenção dos parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e toxicológicos de juvenis e adultos devem ser examinadas ao menos 60 amostras sanguíneas de indivíduos diferentes por temporada reprodutiva, distribuídas ao longo da temporada. Animais recapturados também devem ter amostras coletadas e analisadas, sem prejuízo para o n mínimo de 60 indivíduos diferentes. Para juvenis, devem ser analisados pelo menos 15 indivíduos por trimestre, totalizando 60 por ano. Juvenis



recapturados também devem ter amostras coletadas e analisadas, sem prejuízo para o n mínimo de 15 indivíduos diferentes.

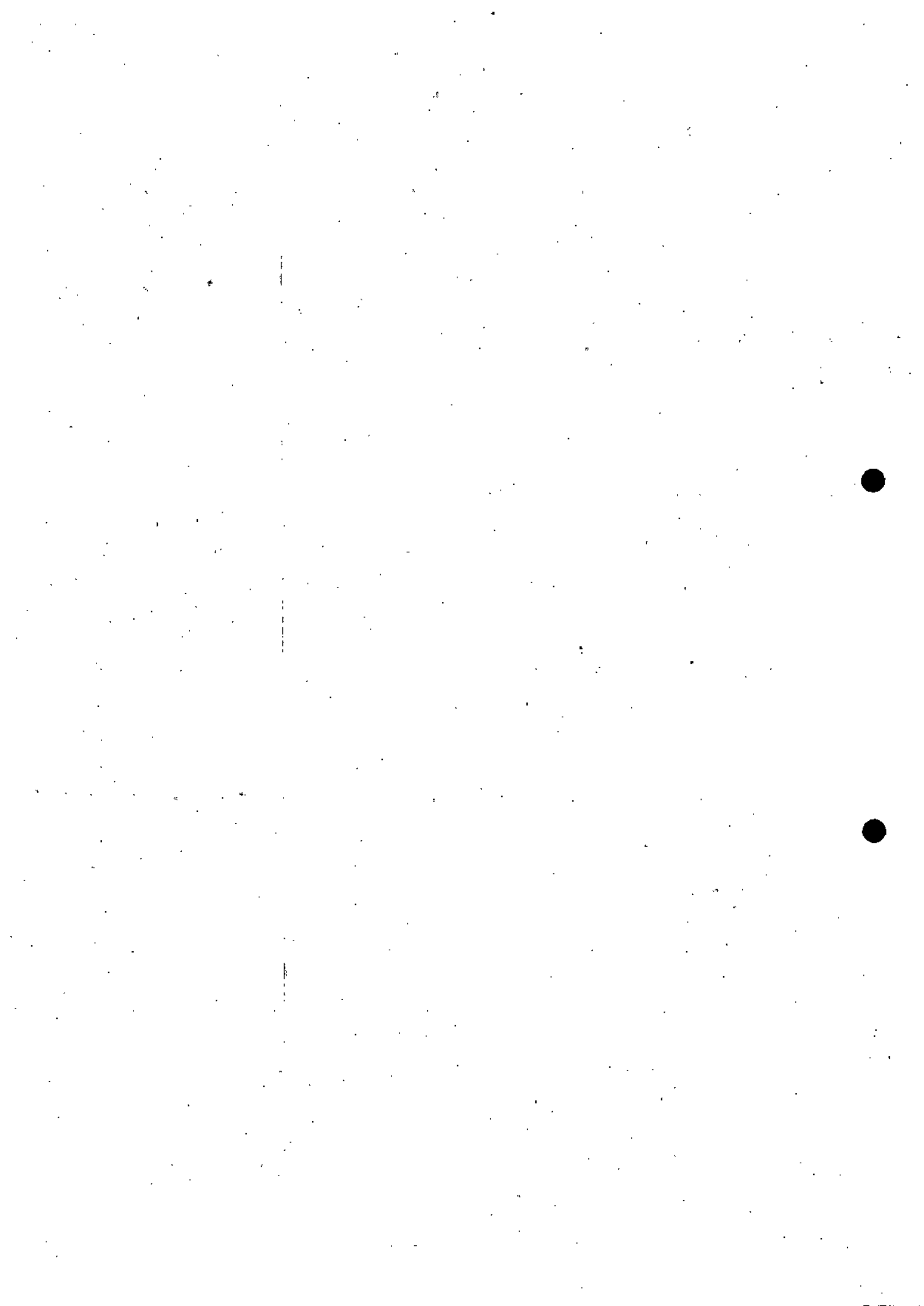
Para ovos e filhotes deverá ser obtido um mínimo de três ovos e filhotes por ninho, que podem ser avaliados individualmente ou em *pool*, totalizando 60 ninhos por temporada para *Caretta caretta* e 45 para *Dermochelys coriacea*.

Em adultos e juvenis os seguintes parâmetros devem ser analisados:

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

Em ovos e natimortos:

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



- Periodicidade/intervalos amostrais, produtos gerais e avaliações desejadas

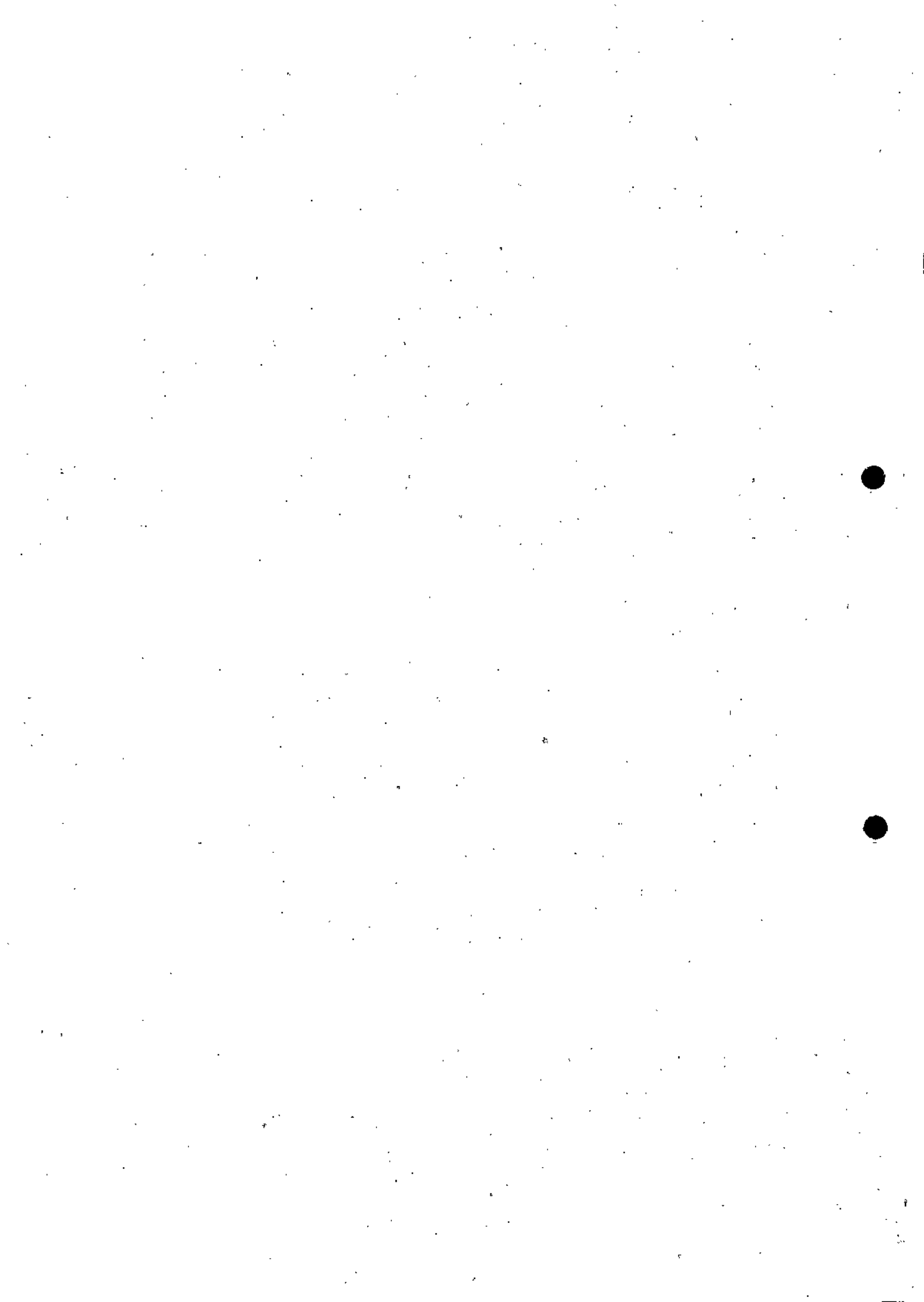
Ao término do Anexo 6 são sumarizadas as periodicidades e intervalos amostrais dos estudos propostos em quadro informativo. As periodicidades/intervalos devem ser seguidas à risca para não prejudicar o planejamento de campanhas e o delineamento amostral previsto. Os quatro produtos gerais previstos serão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

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

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

3.7.1 Objetivos

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



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

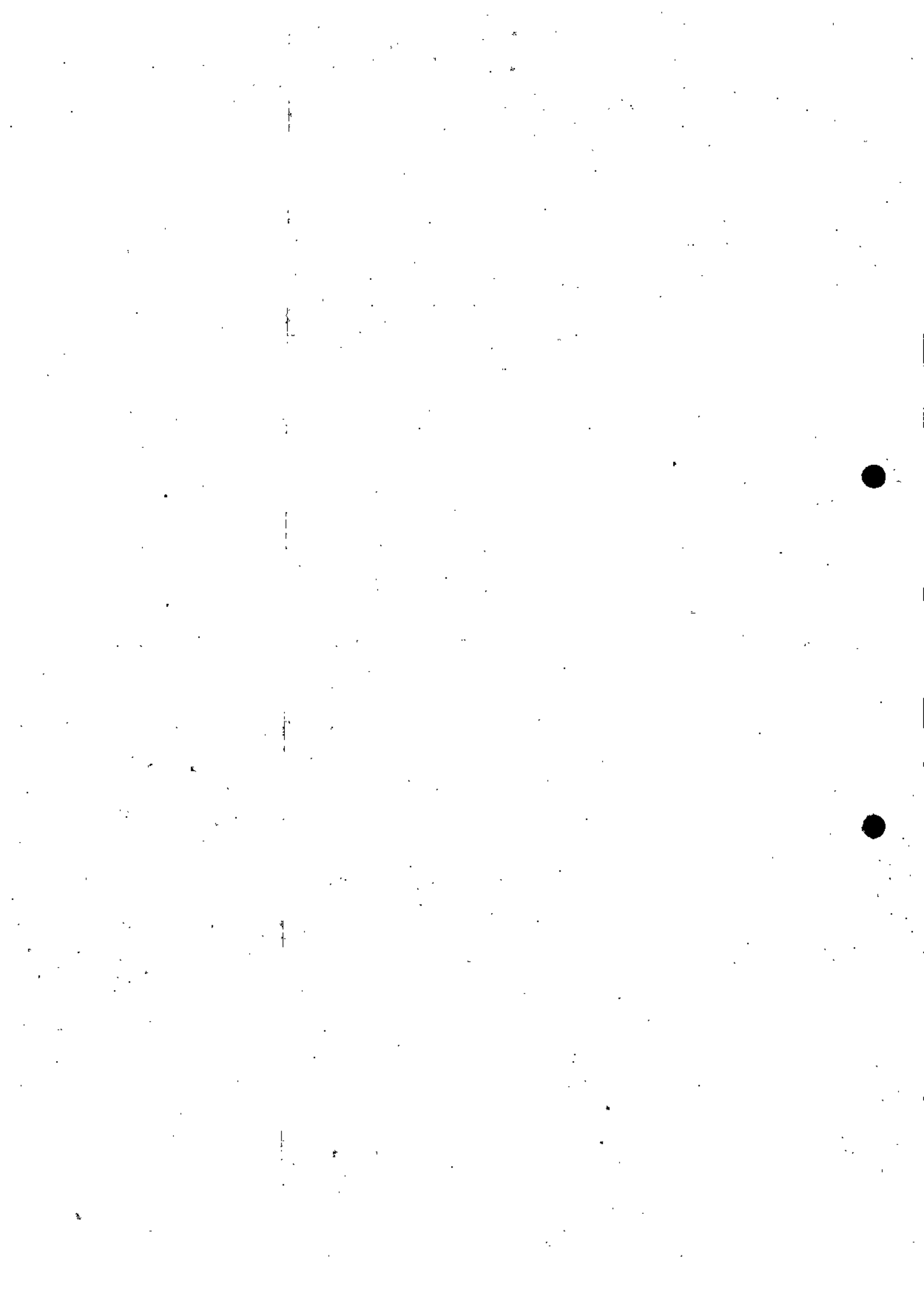
3.7.2 Área de Estudo

São propostos 91 pontos de amostragem contemplando as regiões dulcícola, marinha e estuarina, conforme Quadro 10. Segundo o Anexo 7, esta área abrange mais de 130 km, sendo oito pontos no rio Doce e os demais distribuídos ao norte do rio Doce (foz do rio Ipiranga em Urussuquara - ES, rio São Mateus - ES e rio Caravelas - BA, este último na Reserva Extrativista de Cassurubá).

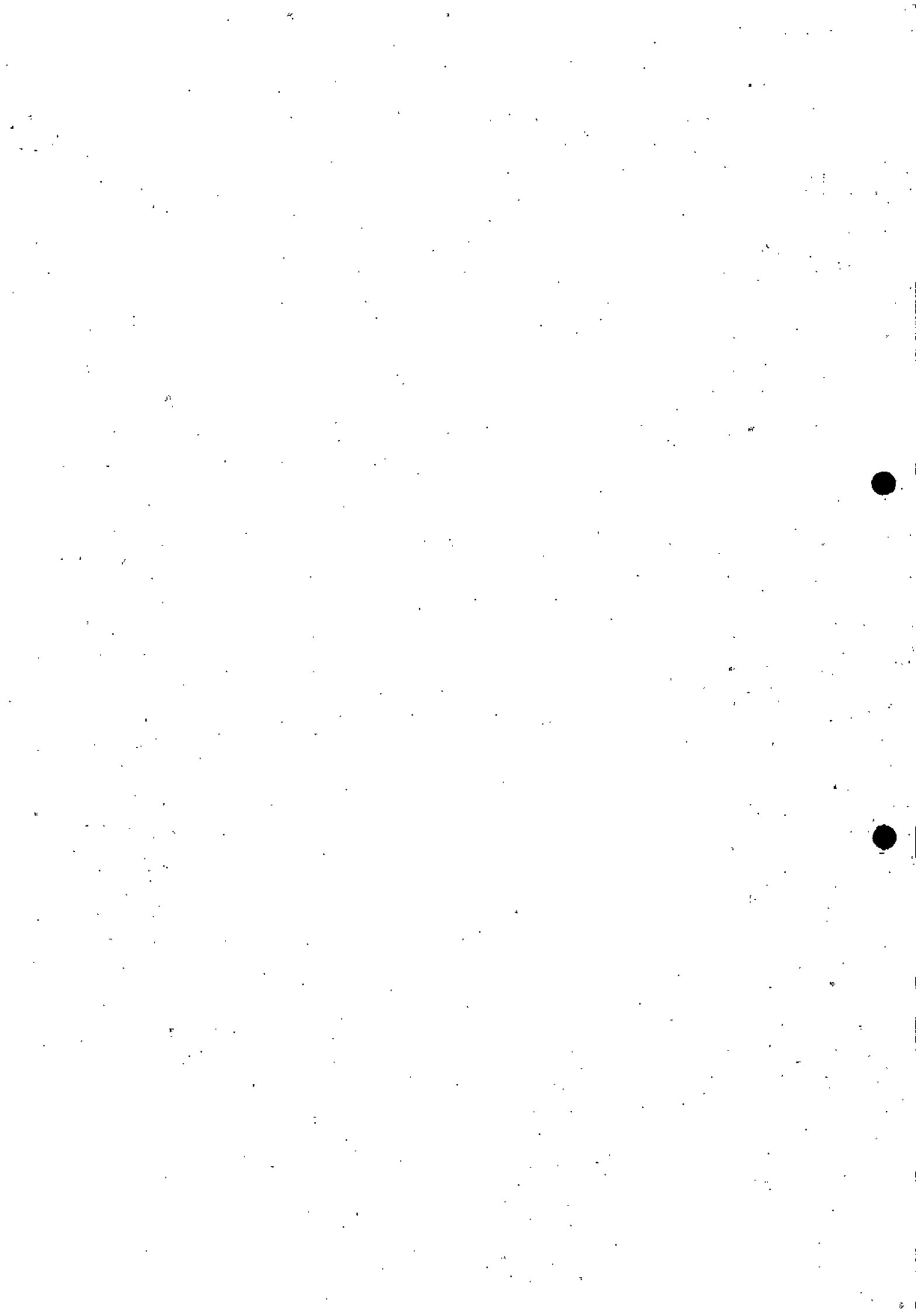
Para os estudos de ecologia trófica, são propostos seis pontos equidistantes 2 km entre si, sendo dois na região interna à foz do rio Doce, um na região adjacente à foz e três pontos na região externa à foz. Para permitir a comparação entre os ambientes, o mesmo desenho amostral é proposto para o estuário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

Quadro 10 - Pontos de amostragem do Anexo 7 - TR4 para monitoramento da ictiofauna e carcinofauna.

Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
Ponto 1	Rio Doce	305077,58	7841603,14
Ponto 2		350963,58	7839489,41
Ponto 3		377966,41	7848097,06
Ponto 4		402950,58	7848549,33
Ponto 5		355728,46	7837501,13
Ponto 6		348718,03	7839780,93
Ponto 7		376785,70	7850610,93
Ponto 8		320335,78	7838805,01
I1		407337,87	7772381,14

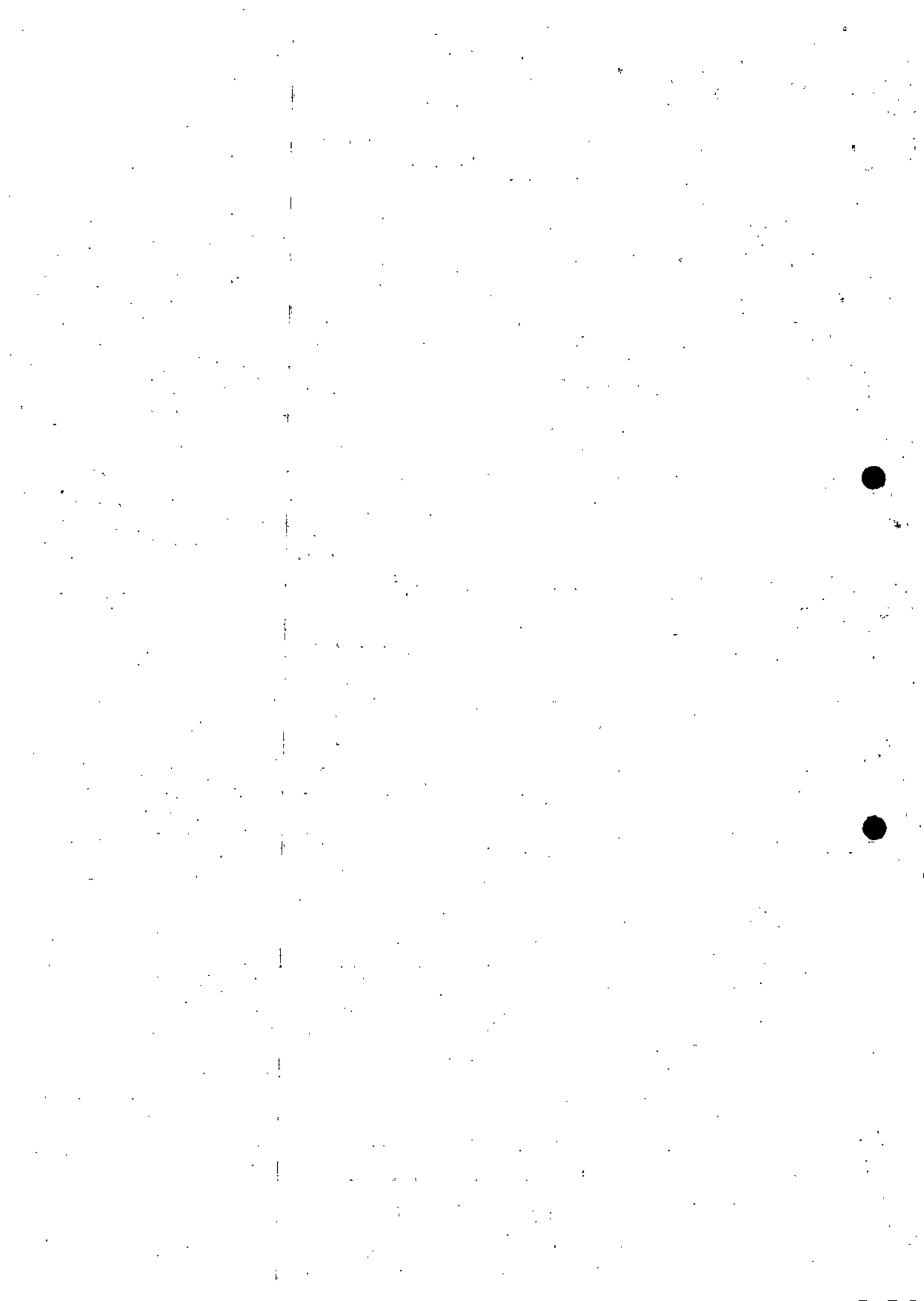


Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
I2	Recifais	411663,74	7782961,89
I3		391744,43	7787277,00
I4		411675,47	7795169,07
I5		400469,81	7781684,29
LTI-1	Recrutamento	407337,87	7824607,90
LTI-2		411663,74	7827116,61
LTI-3		391744,43	7831277,23
LTI-4		411675,47	7821212,55
LTI-5		400469,81	7824770,89
LTI-6		407337,87	7830006,85
LTI-7		411663,74	7817995,46
LTI-8		391744,43	7820781,19
LTI-9		411675,47	7827306,88
1U	Dieta e rede trófica estuarina	415006,43	7830273,22
2U,C	Estuarino-costeiro	414329,06	7828656,64
3U,C		416400,12	7825016,13
4U	Dieta e rede trófica estuarina	418254,77	7823487,01
5U		419688,59	7825088,34
6U		416306,07	7822093,09
7U		423673,44	7818070,29
8U		427261,81	7827151,81
9U		415382,72	7812452,33
7C	Estuarino-costeiro	423673,36	7818070,29
8C		427261,88	7827151,70
9C		415382,84	7812452,22
SM1		419729,59	7942784,41
SM2		421462,99	7943423,34
SM3		425157,36	7942551,23
SM4		427286,31	7941979,87
SM5		427434,80	7943853,90
SM6		426991,40	7939871,21
C1-R1	Recifais	447820,21	7939121,35
C1-R2		455177,06	7937015,80
C1-R3		441812,80	7910334,76
R4		441749,71	7910301,37
C1-R5		442097,40	7910258,19
C1-R6		453782,16	7912448,51
C1-R7		445680,83	7923856,85
LTC1-1	Recrutamento	423650,67	7940046,14
LTC1-2		424377,99	7942826,43
LTC1-3		424184,08	7946466,09
LTC1-4		425518,27	7939931,87



Ponto de Amostragem	Área/Tipo de Estudo	Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS2000)	
		x	y
LTC1-5		426013,41	7942799,69
LTC1-6		426177,86	7946628,86
LTC1-7		427575,17	7939961,98
LTC1-8		427838,60	7942806,73
LTC1-9		427824,24	7946579,87
LTC2-1		423650,67	7940046,14
LTC2-2		424377,99	7942826,43
LTC2-3		424184,08	7946466,09
LTC2-4		425518,27	7939931,87
LTC2-5		426013,41	7942799,69
LTC2-6		426177,86	7946628,86
LTC2-7		427575,17	7939961,98
LTC2-8		427838,60	7942806,73
LTC2-9		427824,24	7946579,87
C2-1	Recifais	474116,82	8009056,39
C2-2		471433,92	8012250,08
C2-3		479415,88	8013344,30
C2-4		477337,41	8016107,92
C2-5		485373,35	8018328,24
C2-6		485329,49	8020341,78
C3-1		494710,00	8035127,26
C3-2		498674,36	8034873,47
C3-3		499766,17	8031288,98
C3-4		500720,19	8037550,83
C3-5		500349,25	8042761,65
C3-6		500285,67	8045759,79
C4-1		531838,62	8013672,27
C4-2		531754,70	8014159,21
C4-3		530725,98	8013131,92
C4-4		537834,50	8015111,01
C4-5		537594,21	8011283,40
C4-6		537651,54	8013573,49
PA0,U	Dieta e rede trófica estuarina	375820,22	7793544,25
PA1,U		376858,51	7794813,34
PA2,U		378437,41	7793066,02
PA3,U		382853,89	7793805,00
PA4,U		384973,95	7793562,60
PA5,U		386548,77	7794865,64
PA6,U		384597,91	7791417,55

Fonte: Anexo 7, TR4.



Sugere-se que os pontos no rio Doce sejam suprimidos em favor dos pontos a serem definidos para as amostragens relacionadas ao Anexo 2, de forma a evitar a sobreposição de esforços entre os estudos.

3.7.3 Metodologias e Periodicidade

- **Ictiofauna**

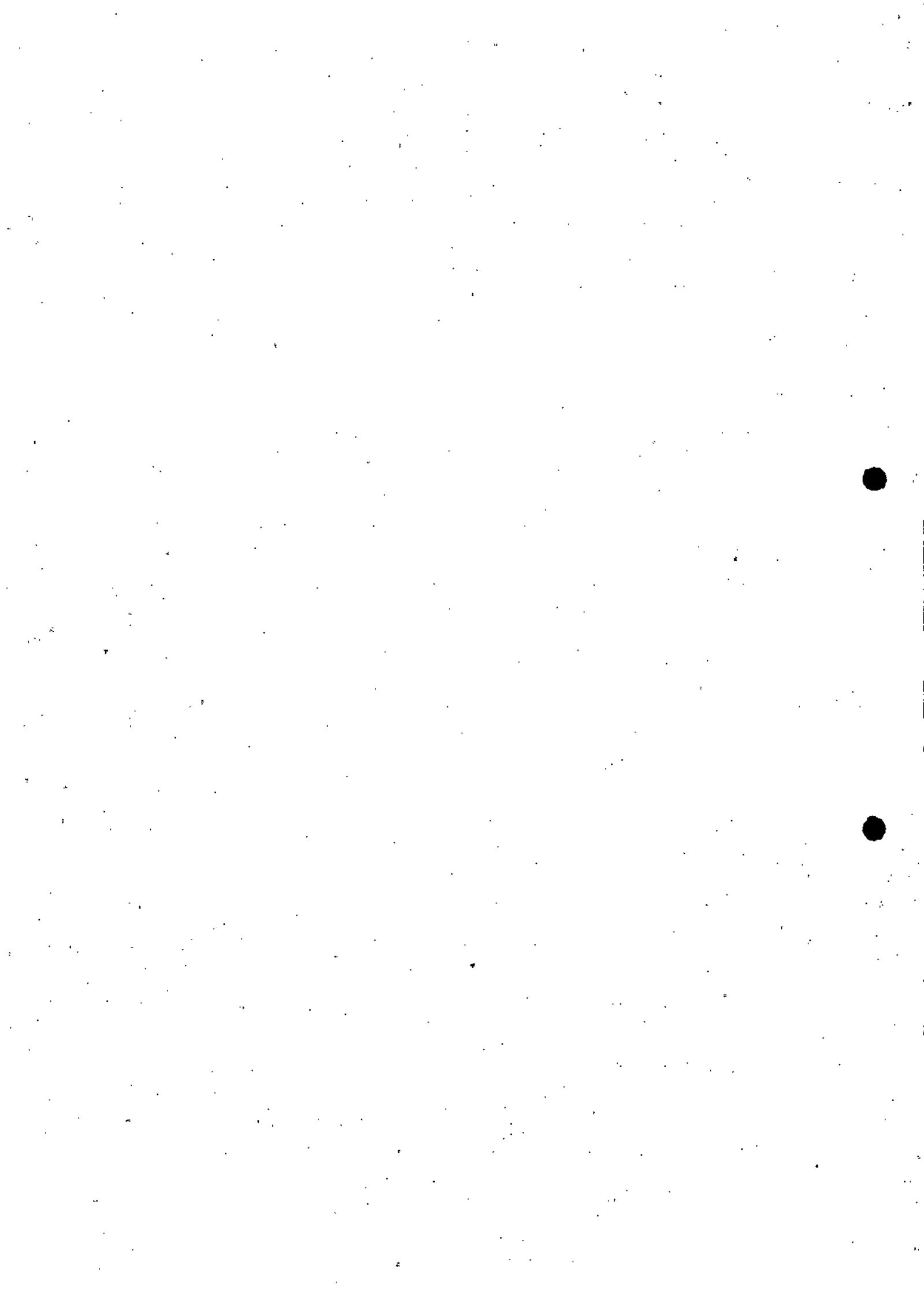
O Anexo 7 propõe cinco anos de duração para o monitoramento inicial. O primeiro ano será reservado a uma análise diagnóstica de curto prazo com coletas mensais, quando apenas os parâmetros ecológicos (comunidades, populações e relações com hábitat) serão analisados. Conforme os resultados obtidos, serão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

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

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

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

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



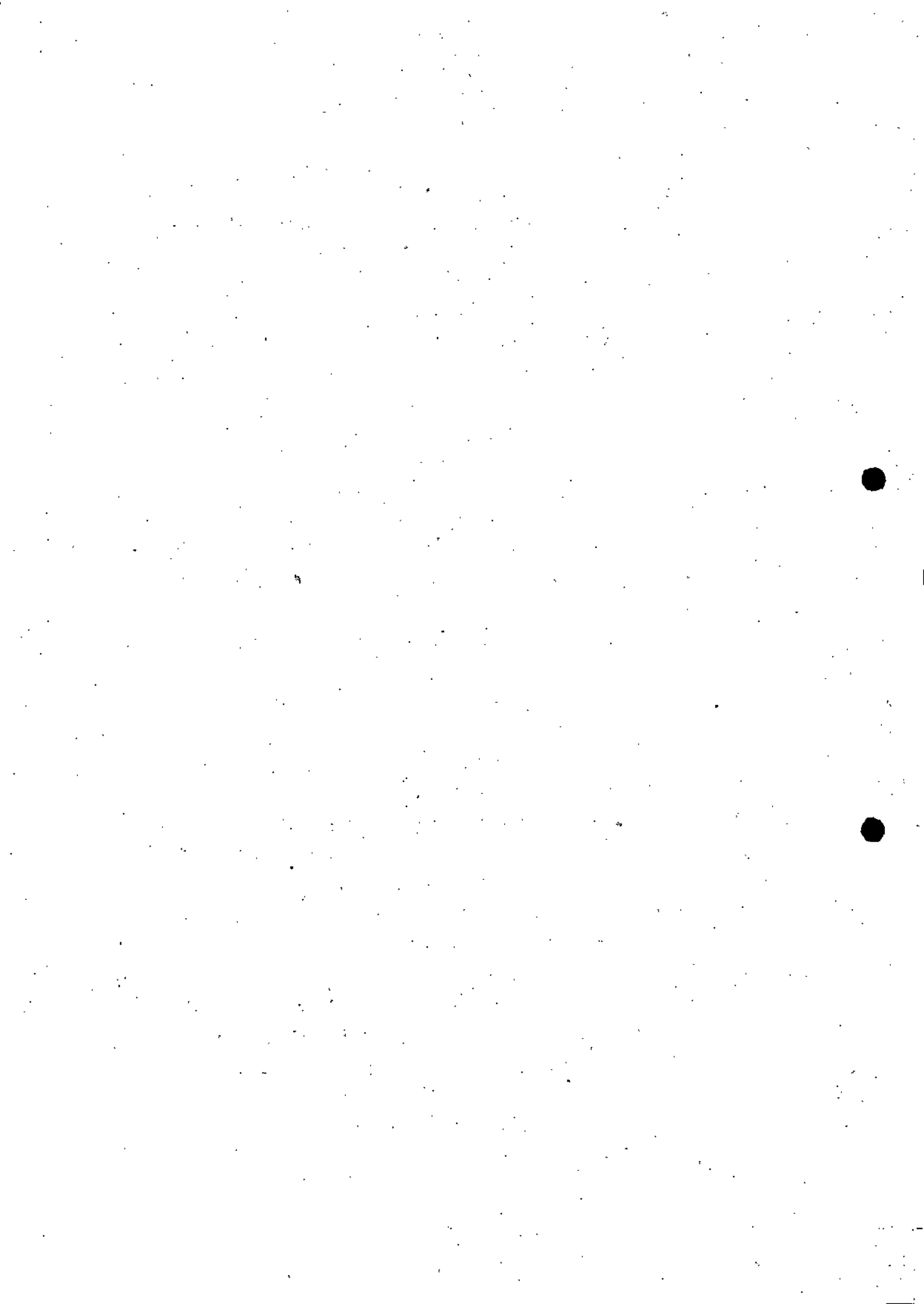
fisiográficas do corpo d'água e as características biológicas e ecológicas das espécies. O esforço deve ser padronizado para cada petrecho. Estas exigências já são feitas no Anexo 2, atualmente em revisão, e aqui se reforça a sugestão de evitar sobreposições entre os estudos do TR4.

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

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

O Anexo 7 define que sejam retiradas amostras de tecidos de todos os espécimes coletados para análises genéticas. Considerando-se o elevado custo destas análises, relacionadas ao número de indivíduos que deve ser coletado, sugere-se a retirada desta exigência ou a definição de um número máximo de exemplares por espécie e por ponto para a coleta deste material.

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



Composição e estrutura de comunidades

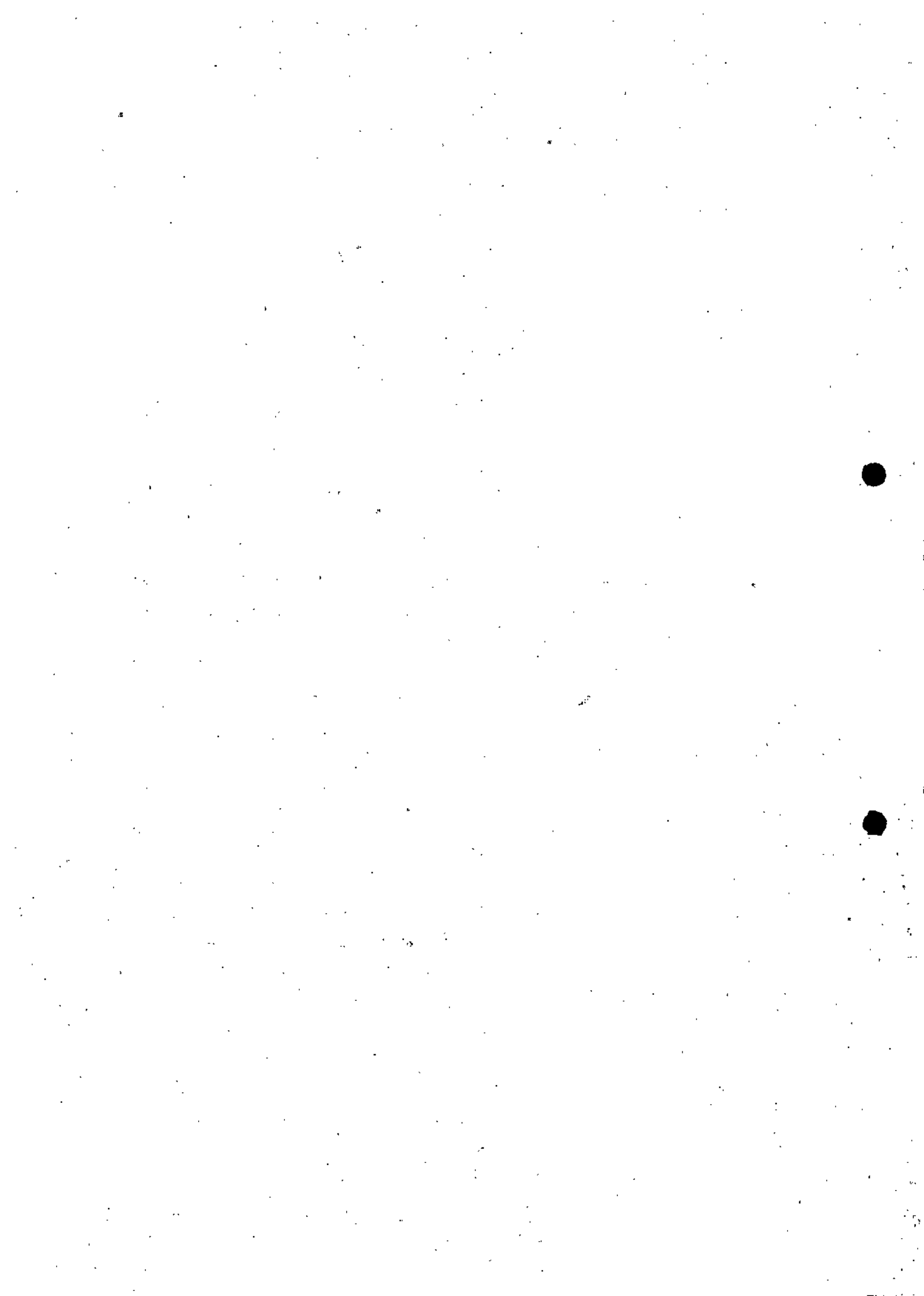
A composição da ictiofauna será apresentada em tabelas (lista de espécies total e por ponto de amostragem), indicando nome científico, nome popular, número de coleta e pontos de amostragem onde foram registradas. As espécies serão ainda ser classificadas como raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras e comerciais segundo legislação vigente e bibliografia especializada. A Fundação Renova sugere, ainda, que também sejam indicadas as espécies ameaçadas por sobreexploração.

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

Como descritores da comunidade, serão usados os seguintes índices:

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

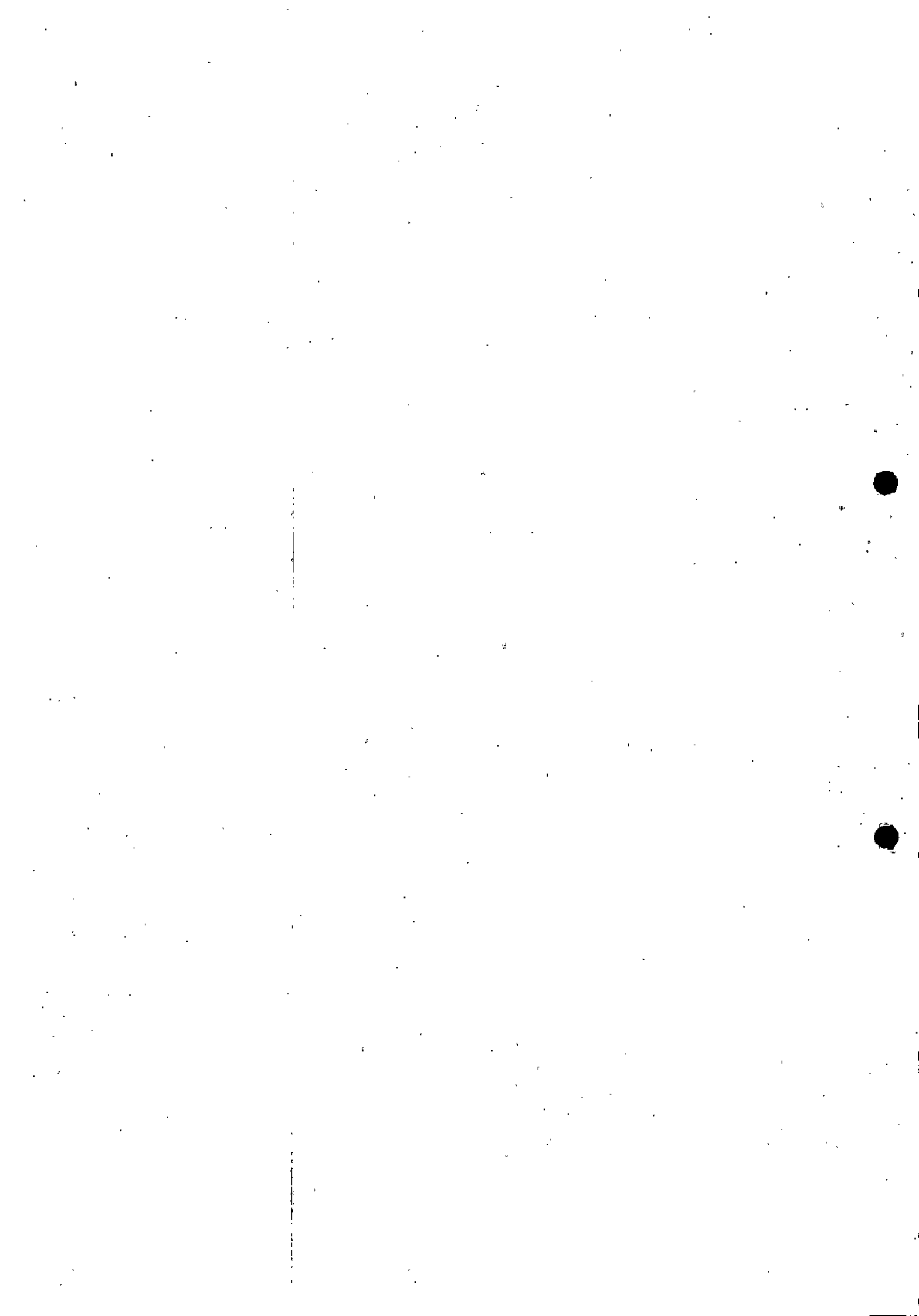
Análises multivariadas são propostas para verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies (GAUCH JR., 1986; MANLY, 1997) e influência das



características ambientais/fisiográficas/geográficas dos pontos de amostragem sobre a distribuição das espécies (MANLY, 1997; TER BRAAK & SMILAUER, 2002).

Serão selecionadas espécies de peixes, de preferência de grande porte e de interesse comercial, para monitoramento por telemetria quanto à utilização do hábitat. Estações acústicas serão utilizadas para detectar transmissores implantados cirurgicamente em exemplares destas espécies. Espera-se que a telemetria produza dados sobre o processo de recolonização e movimentação das espécies monitoradas na região do rio Doce. O emprego da análise da microquímica de otólitos (razões Ca:Sr) tem como objetivo descrever a utilização de estuários e áreas costeiras adjacentes por indivíduos adultos e juvenis, uma vez que alterações de salinidade causam mudanças nas razões Ca:Sr. Este monitoramento por telemetria e otólitos deverá ocorrer no segundo e quinto anos, conforme mencionado anteriormente para a obtenção de parâmetros populacionais.

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



Estrutura e dinâmica de populações

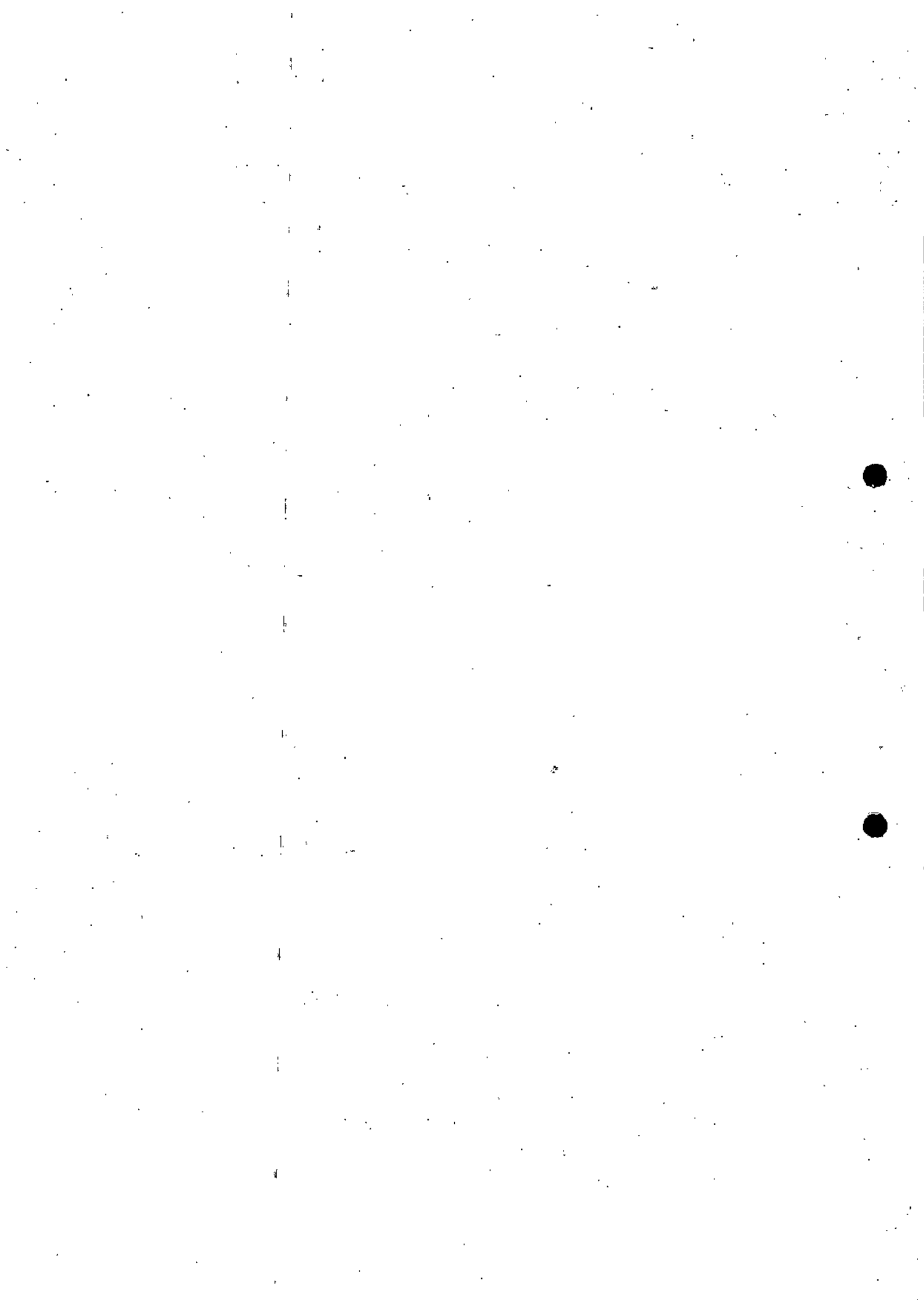
Devem ser apresentadas informações prévias ao rompimento disponíveis na literatura científica para espécies de peixes (diagnóstico prévio), contendo, sempre que possível, a estrutura das populações das espécies mais abundantes e das espécies importantes para a pesca. Para as espécies ameaçadas de extinção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

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

Ecologia Trófica

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

Para cada amostra é retirada uma alíquota de aproximadamente 0,8 mg, depositada em cápsula de estanho de 5×9 mm. As alíquotas encapsuladas são armazenadas em caixas com nomenclatura alfanumérica e enviadas para análises elementares e de isótopos estáveis (carbono e nitrogênio). As alíquotas são então incineradas em um analisador elementar e os gases resultantes (CO_2 e N_2) transferidos para um espectrômetro de massa de razão isotópica. Os resultados serão apresentados em



notação delta (δ) com base em materiais padrão [partes por mil do desvio do material padrão (‰) de nitrogênio atmosférico para nitrogênio e Pee Dee Belemnite carbonato calcário, para carbono] de acordo com a fórmula:

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

Onde:

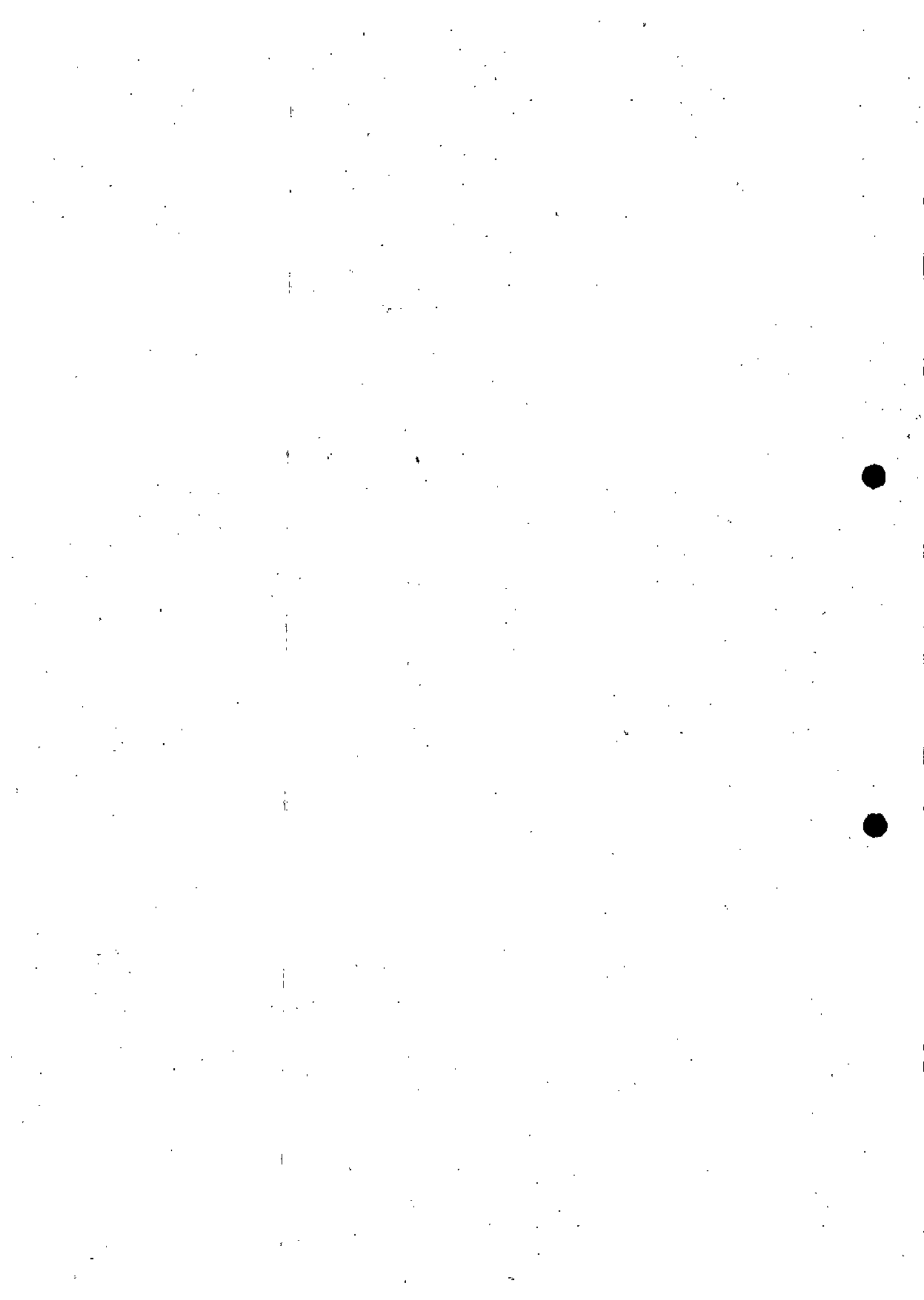
X é ^{13}C ou ^{15}N e $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

Além dos músculos de peixes, seus potenciais itens alimentares (moluscos, crustáceos, poliquetas, etc.) e produtores primários da área de estudo também serão coletados para descrever se houve mudanças na estrutura trófica da área estudada logo após o impacto (primeiros 12 meses) e no período subsequente (monitoramento, 24 meses seguintes). As alterações nas estruturas tróficas (mudança de nível trófico, por exemplo) podem indicar também a remoção ou acréscimo de algum componente na rede trófica, que, segundo o Anexo 7, foram causadas pelo impacto.

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

Biologia Reprodutiva

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



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

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

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

Análise de peixes recifais

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

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



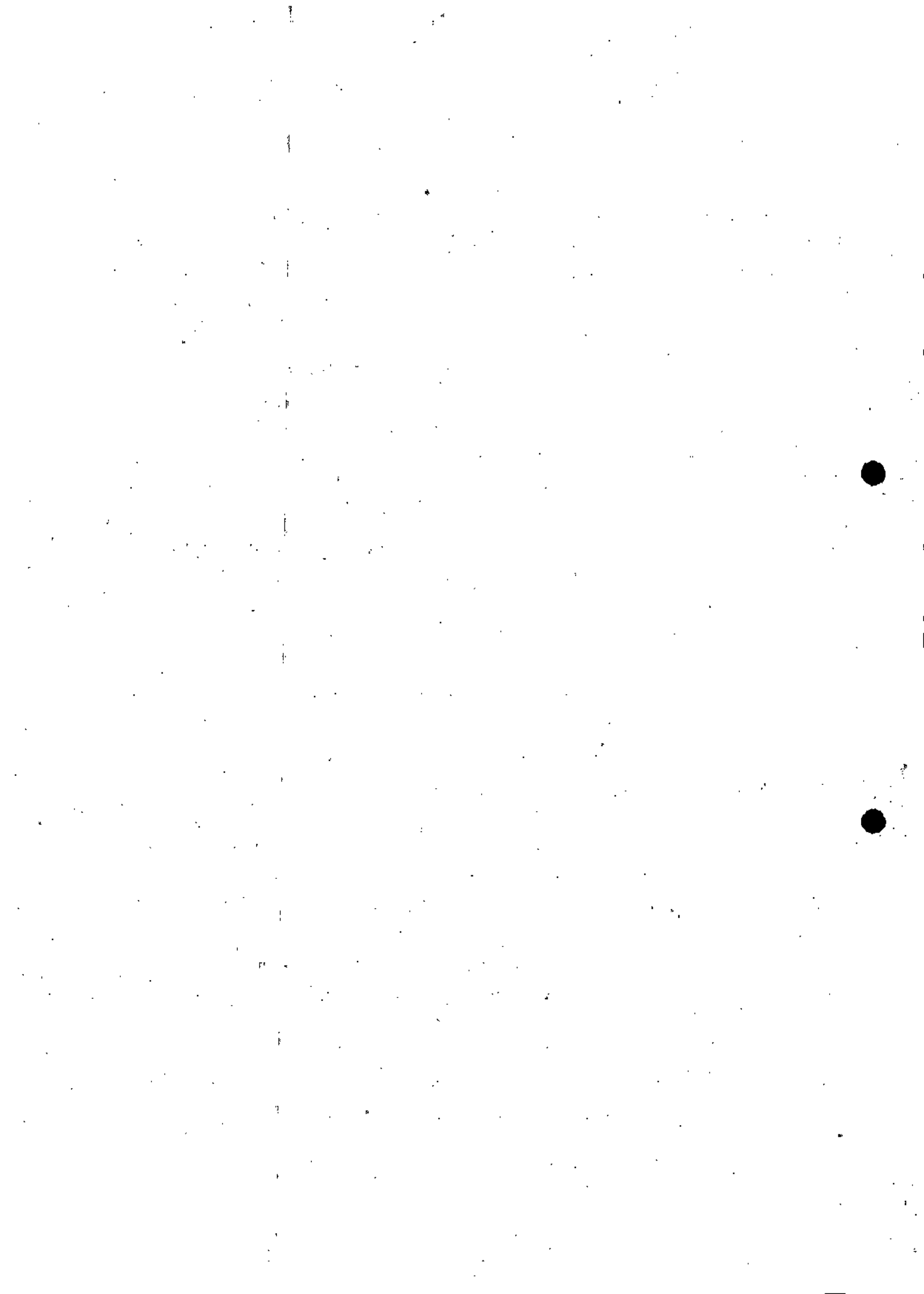
A abundância e estrutura de tamanho dos peixes serão estimadas e as espécies identificadas por mergulhadores treinados e calibrados para as estimativas de tamanho. A abundância será registrada em classes de abundância na escala logarítmica (base 2) e a estimativa de tamanho de 2 em 2cm. Sugere-se que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

Sugere-se que a realização de análises genéticas para os objetivos mencionados acima, devido ao alto custo, seja retirada do escopo ou que sejam definidas espécies-alvo representativas (para racionalização do número de espécies a serem analisadas) e quantidade máxima de exemplares a serem coletados para esta finalidade.

Genética de populações

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

- ✓ Estimativa da diversidade genética de espécies do rio Doce depositadas em coleções ou bancos genéticos antes da mortandade causada pelo rompimento da barragem;



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

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

Devido ao alto custo das análises genéticas propostas, sugere-se a redução do número de espécies-alvo de 15 para seis (sendo três migradoras e três não-migradoras de diferentes nichos alimentares) e do número de exemplares de 30 para 10 por população.



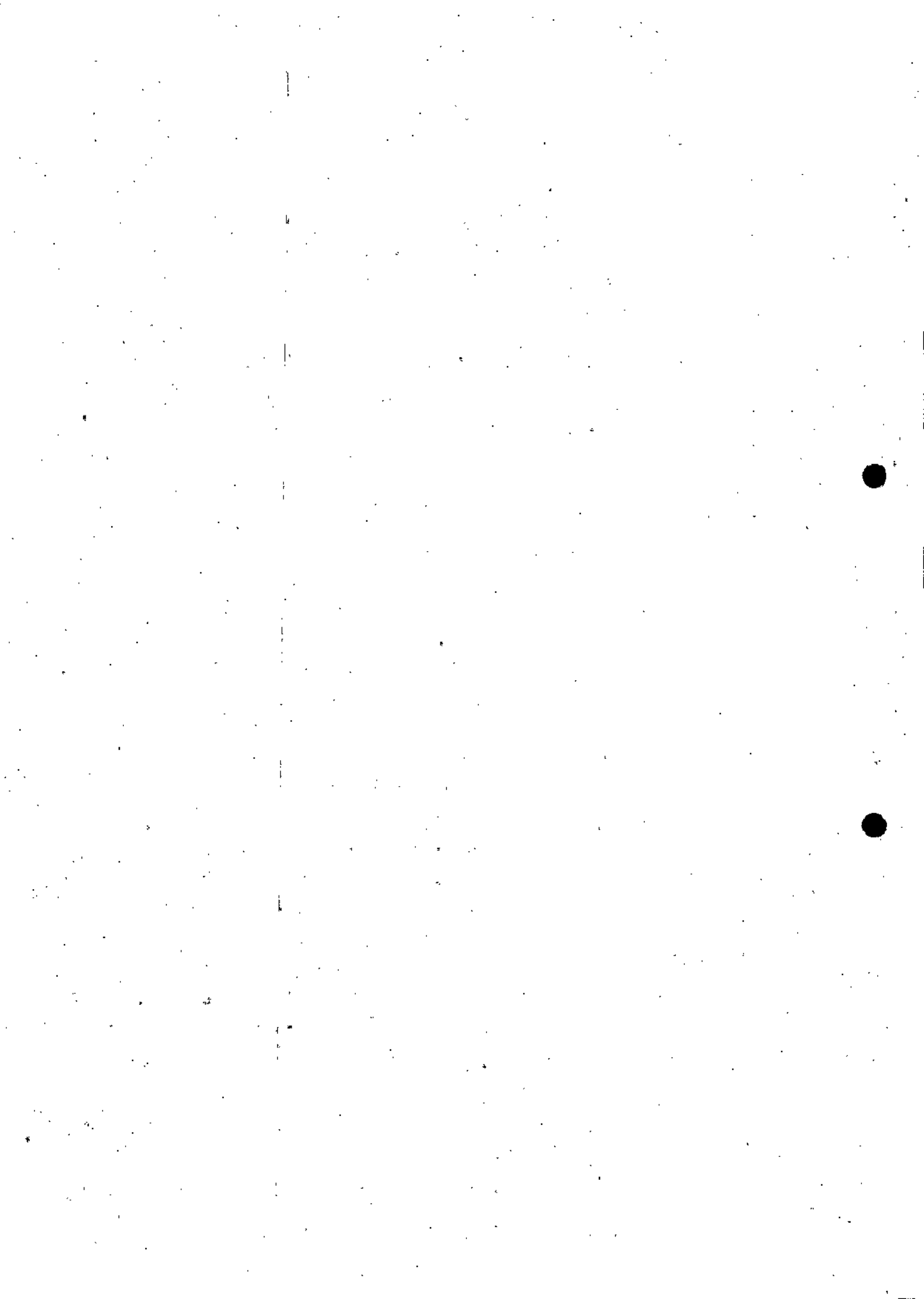
DNA Mitochondrial barcoding

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

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

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

O Anexo 7 justifica a realização destas análises com o DNA mitocondrial para certificação da correta identificação taxonômica das espécies de peixes. Sugere-se que esta análise não seja contemplada no TR4, uma vez que a premissa de que as espécies só poderão ter sua identificação garantida pelo sequenciamento de DNA fragiliza todos os demais programas de monitoramento previstos. Uma vez que estas análises não são propostas para os demais grupos de fauna abrangidos pelo TR4, a premissa de que a identificação correta das espécies só pode ser alcançada pelas técnicas de *barcoding* resulta na implicação de que organismos dos demais grupos biológicos podem ter suas identificações questionadas. Ademais, entende-se que este tipo de análise não contribui para a determinação e mensuração dos eventuais impactos da pluma de rejeitos sobre a ictiofauna e não auxilia na proposição de medidas mitigadoras, caso necessárias.



Integridade ambiental

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

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

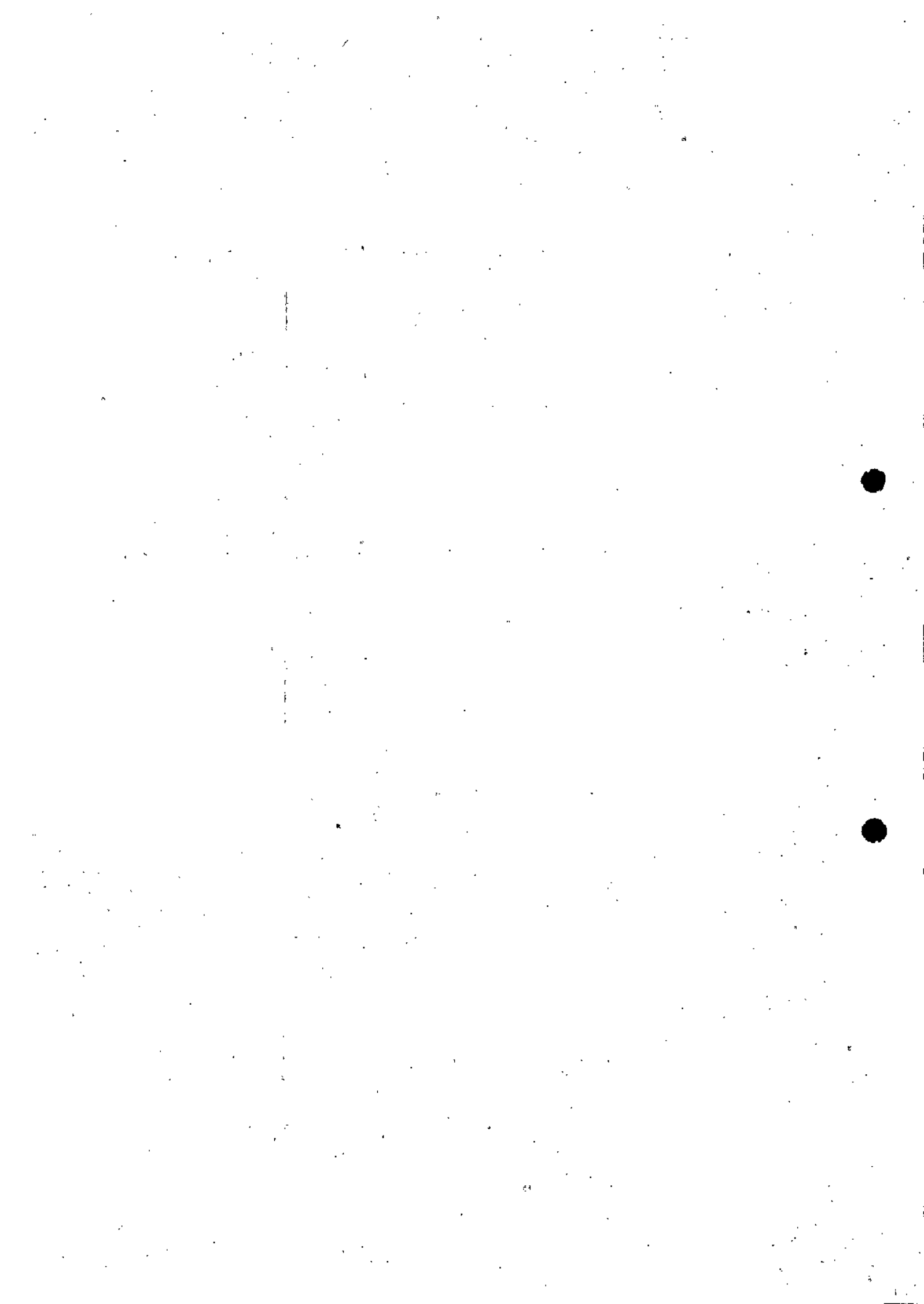
- ✓ impactado = 0 a 40 pontos;
- ✓ alterado = 41 a 60 pontos;
- ✓ natural = 61 a 100 pontos.

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

3.7.4 Produtos

O Anexo 7 define a entrega dos seguintes produtos:

- Cronograma e planejamento logístico de execução dos estudos, que devem ser enviados ao ICMBio até 15 dias antes da primeira coleta;



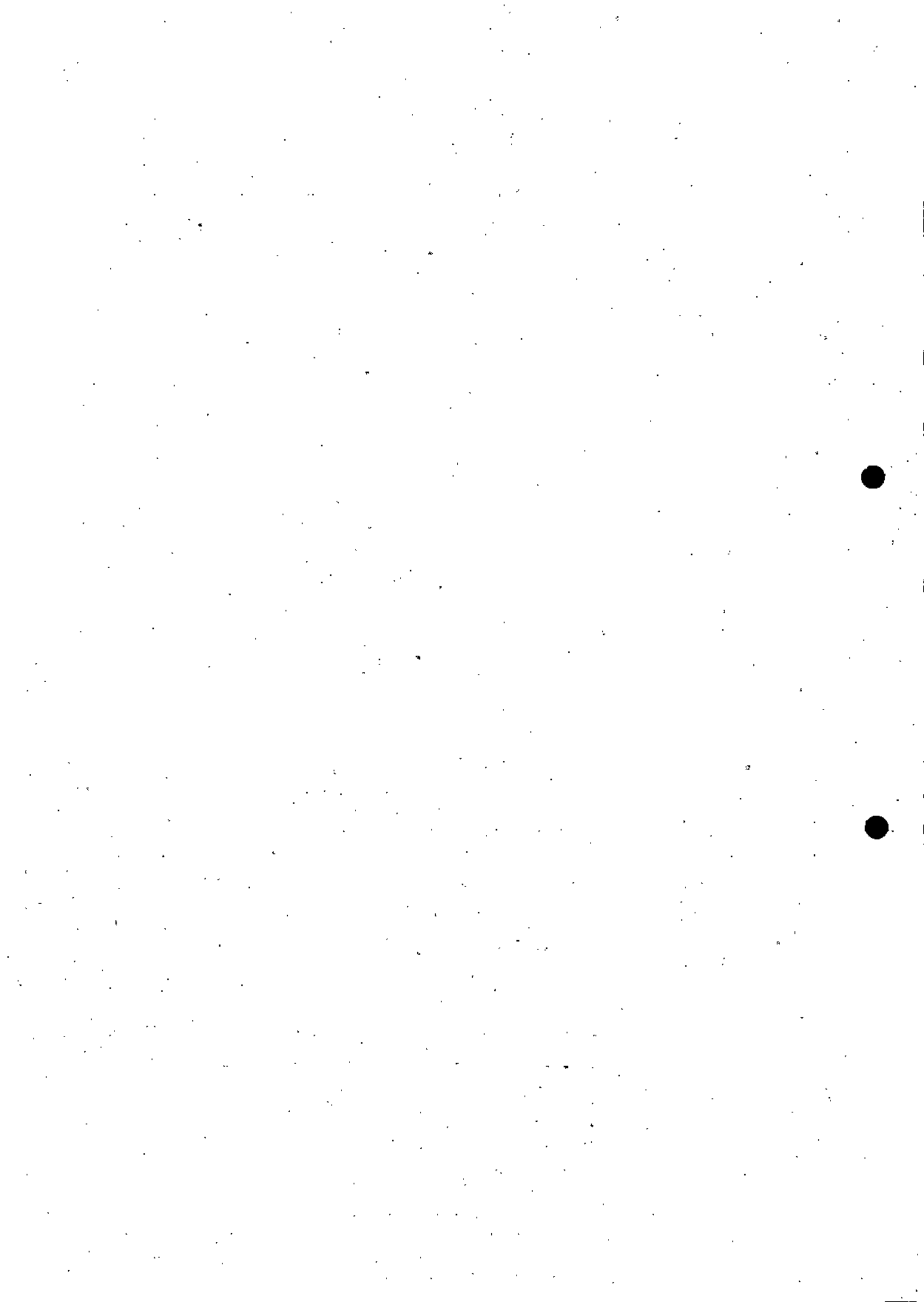
- Relatórios semestrais descrevendo a metodologia empregada, resultados, discussões, análise integrada de todos os componentes monitorados, proposição de ações e medidas de recuperação, avaliação da necessidade de ajustes metodológicos e sugestões;
- Base de dados do monitoramento em planilhas eletrônicas, com os dados de campo e imagens em formato digital, a ser entregue semestralmente juntamente com os relatórios.

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

O Anexo 8 trata de um monitoramento oceânico para a região do Parque Nacional Marinho (PARNAM) dos Abrolhos em vista de sua importância ecológica e do risco potencial de os rejeitos provenientes do rompimento da Barragem de Fundão cheguem ao arquipélago dos Abrolhos. Segundo o Anexo 8, os sobrevoos já realizados evidenciam o deslocamento da pluma de rejeitos para norte, próximo à linha de costa, entre a foz do rio Doce e o sul da Bahia.

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

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



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

3.8.1 Área de Estudo

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

O Anexo 8 define a utilização de um segundo conjunto com seis pontos de amostragem localizados no arco interno dos recifes de Abrolhos (Recifes de Viçosa e de Coroa Vermelha), nos recifes ao sul do arquipélago (dois pontos) e em recifes-controle (Recifes de Fora e de Coroa Alta), estes localizados em Porto Seguro - BA (Quadro 11). No caso dos recifes de Viçosa e Coroa Vermelha, o Anexo menciona que já estão disponíveis dados pretéritos sobre a deposição de sedimentos e da comunidade recifal (CASTRO *et al.*, 2012).

Deve-se observar que os pontos-controle (Recifes de Fora e de Coroa Alta) propostos, conforme mencionado no próprio Anexo 8, não recebem influência de sedimentos fluviais. Por isso, poderiam não ser adequados para comparação com sistemas sob influência de sedimentos. O Anexo menciona, ainda, que o objetivo de incluir estes pontos na malha de amostragem é identificar “possíveis impactos nas comunidades coralíneas em decorrência da chegada de sedimentos oriundos do rompimento da barragem e seus materiais associados”, o que já será feito com a amostragem dos outros pontos selecionados. Além disso, o Anexo menciona a existência de dados pretéritos para dois dos pontos deste segundo conjunto, justamente os que estão



localizados no arco interno dos recifes de Abrolhos, e estes dados poderiam, portanto, servir como parâmetros de comparação para o PARNAM e áreas próximas. Por isso, sugere-se a retirada destes pontos da malha de amostragem e o uso dos dados disponíveis para comparação com as condições anteriores.

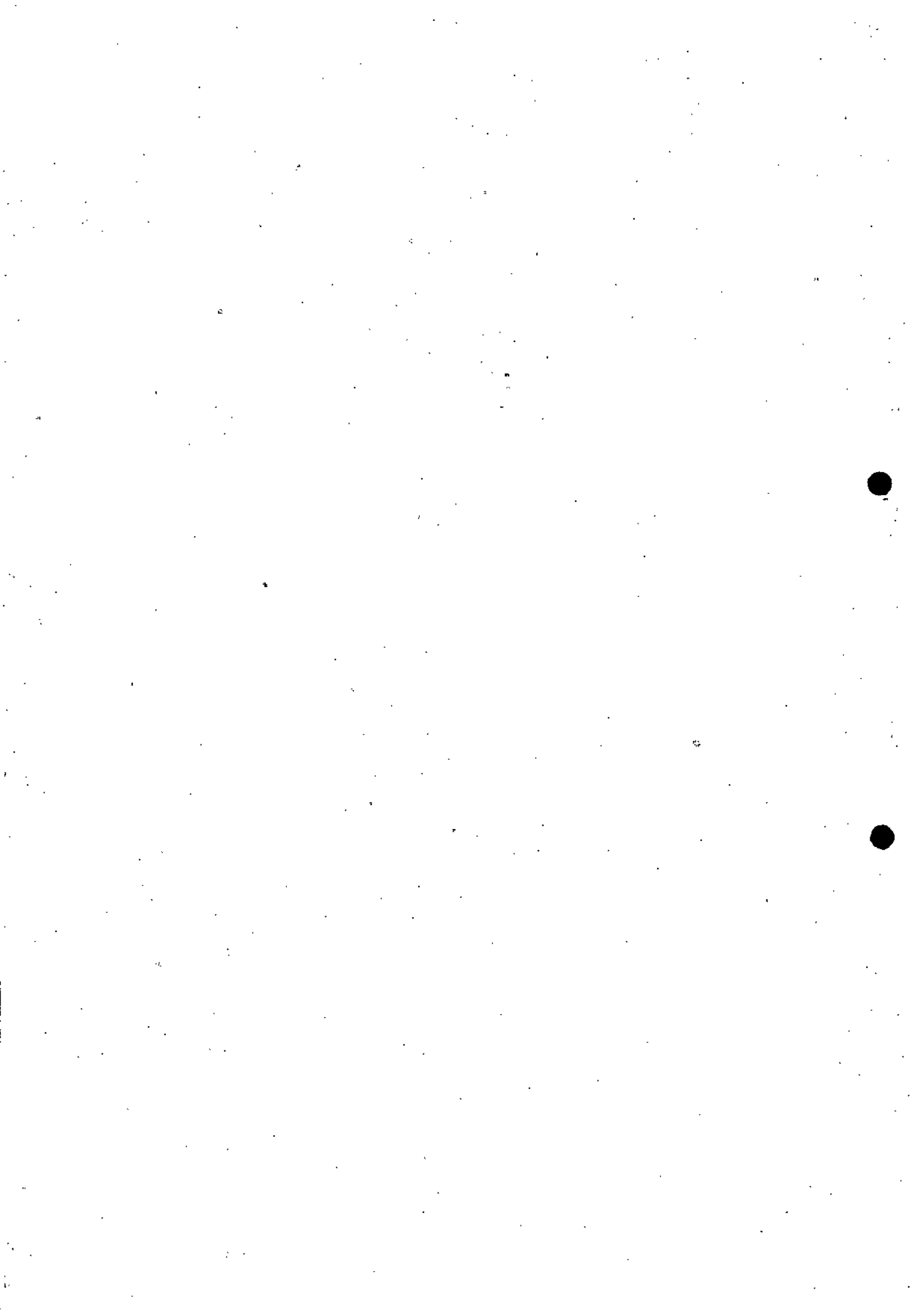
Quadro 11 - Pontos de amostragem do Anexo 8 - TR4 para monitoramento da sedimentação no PARNAM de Abrolhos e região.

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

Fonte: Anexo 8, TR4.

3.9.2 Metodologias

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



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

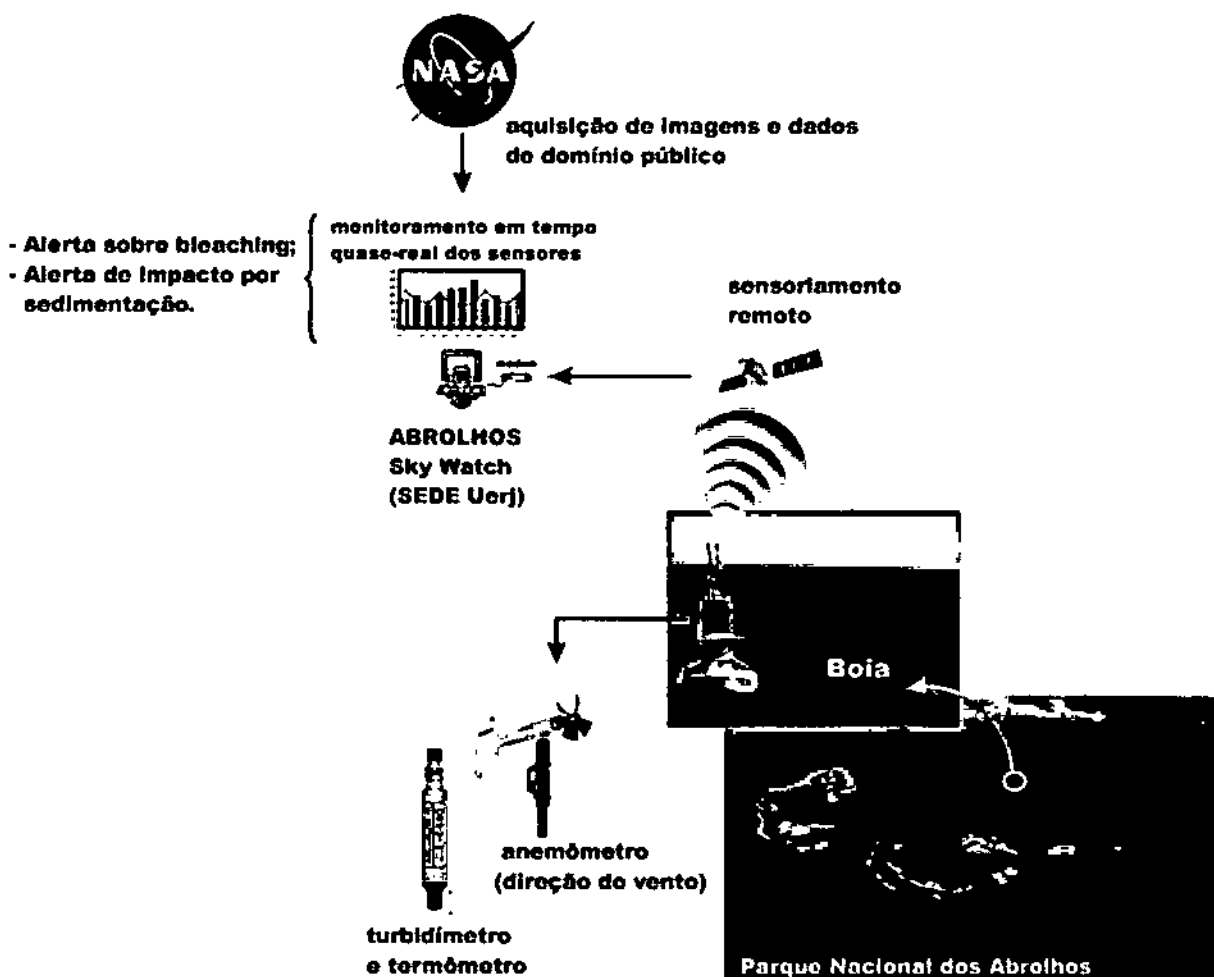
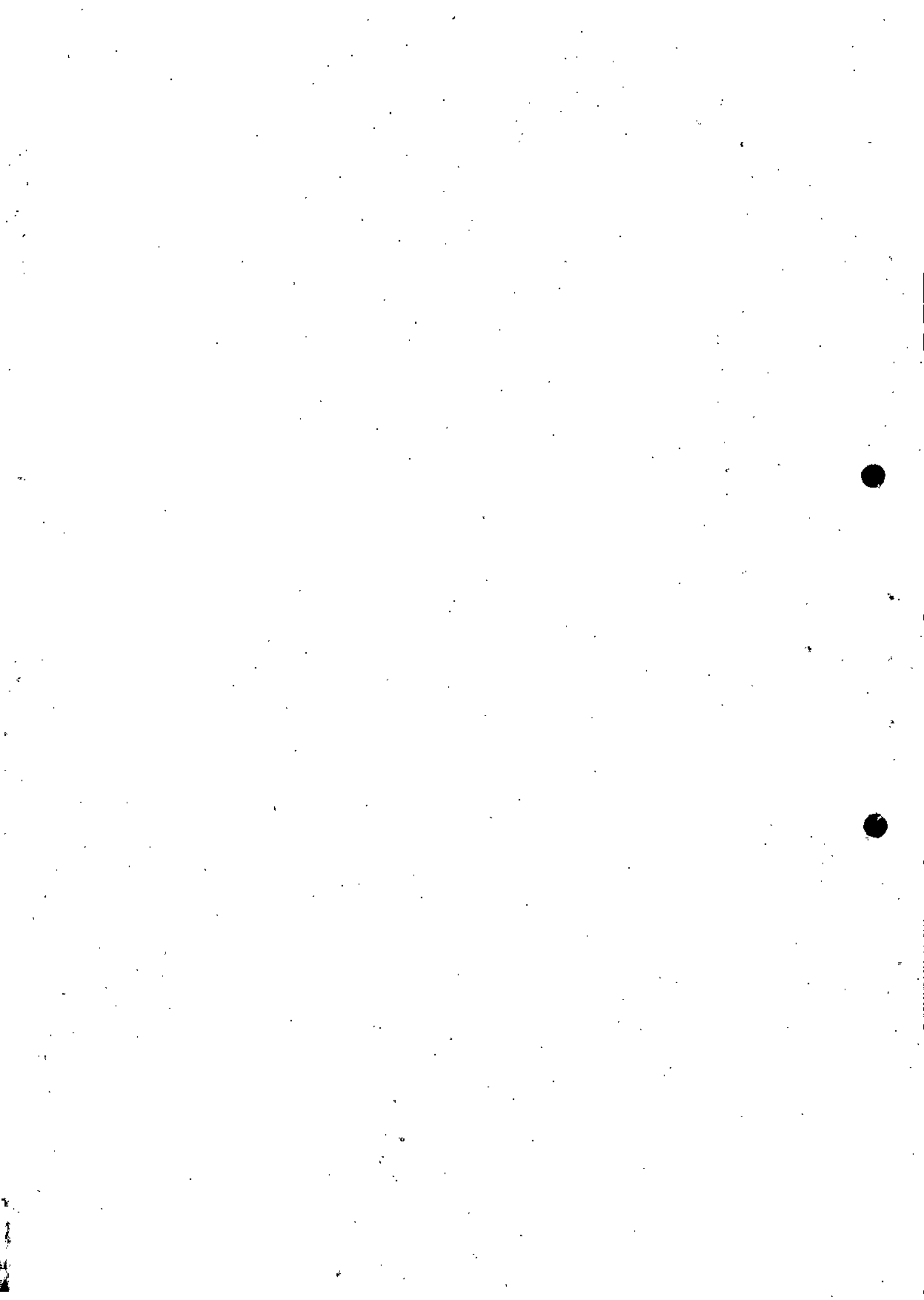


Figura 1 - Diagrama esquemático do sistema proposto. Fonte: Anexo 8, TR4.



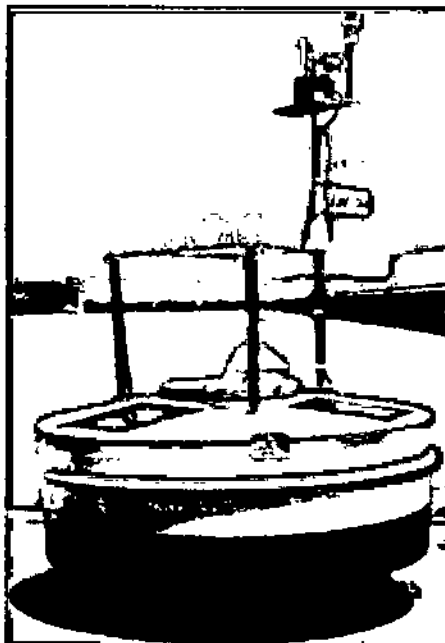
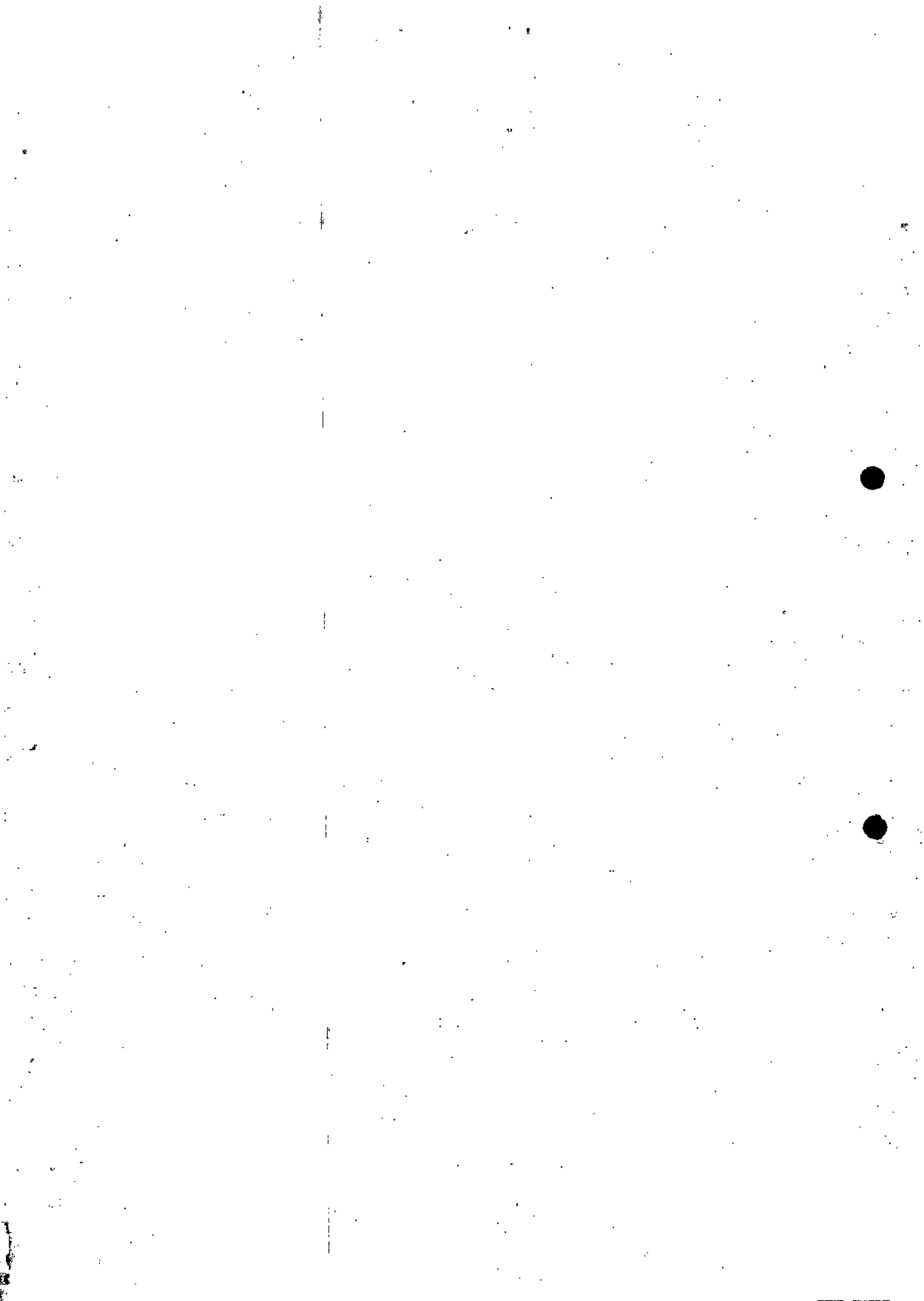


Figura 2 - Modelo de boia oceânica para monitoramento. Fonte: Anexo 8, TR4.

- Material particulado em suspensão na água do mar

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

É proposto um volume de amostra de 20L de água do mar para assegurar a detectabilidade própria da técnica de composição elementar e dos isótopos



radiogênicos (principalmente os isótopos de Nd). As amostras devem ser coletadas, tratadas e analisadas conforme descrito no Anexo 8 do TR4.

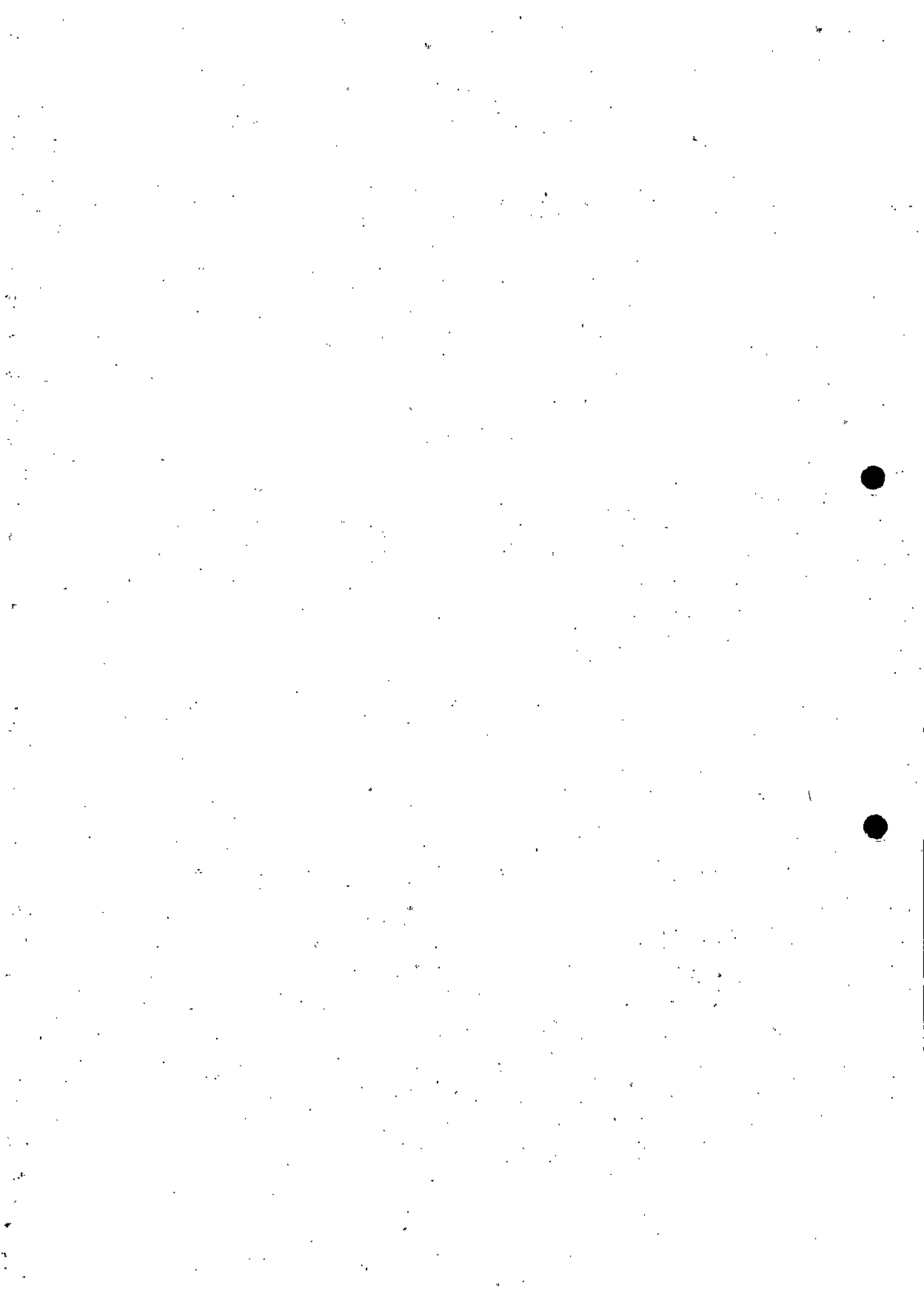
- **Caracterização da Sedimentação em Abrolhos por Isótopos Radiogênicos**

O Anexo 8 propõe a instalação de armadilhas de sedimento nos seis pontos do primeiro conjunto de amostragem do arquipélago dos Abrolhos (Quadro 11) para as análises de isótopos radiogênicos. As armadilhas serão trocadas a cada estação do ano e, adicionalmente, deve-se instalar uma roseta de garrafas de coleta para amostragem mensal, as quais deverão ser trocadas anualmente. Para a identificação da origem continental dos sedimentos, a combinação das assinaturas dos isótopos radiogênicos $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ é descrita pelo Anexo 8 como uma das mais qualificadas, devido, entre outros fatores, às suas razões típicas em determinados domínios geológicos (LEE *et al.*, 2010). Cita-se, ainda, que essas razões não estão sujeitas ao fracionamento isotópico resultante de intemperismo em estudos de curto prazo (GAIERO *et al.*, 2004).

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

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

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



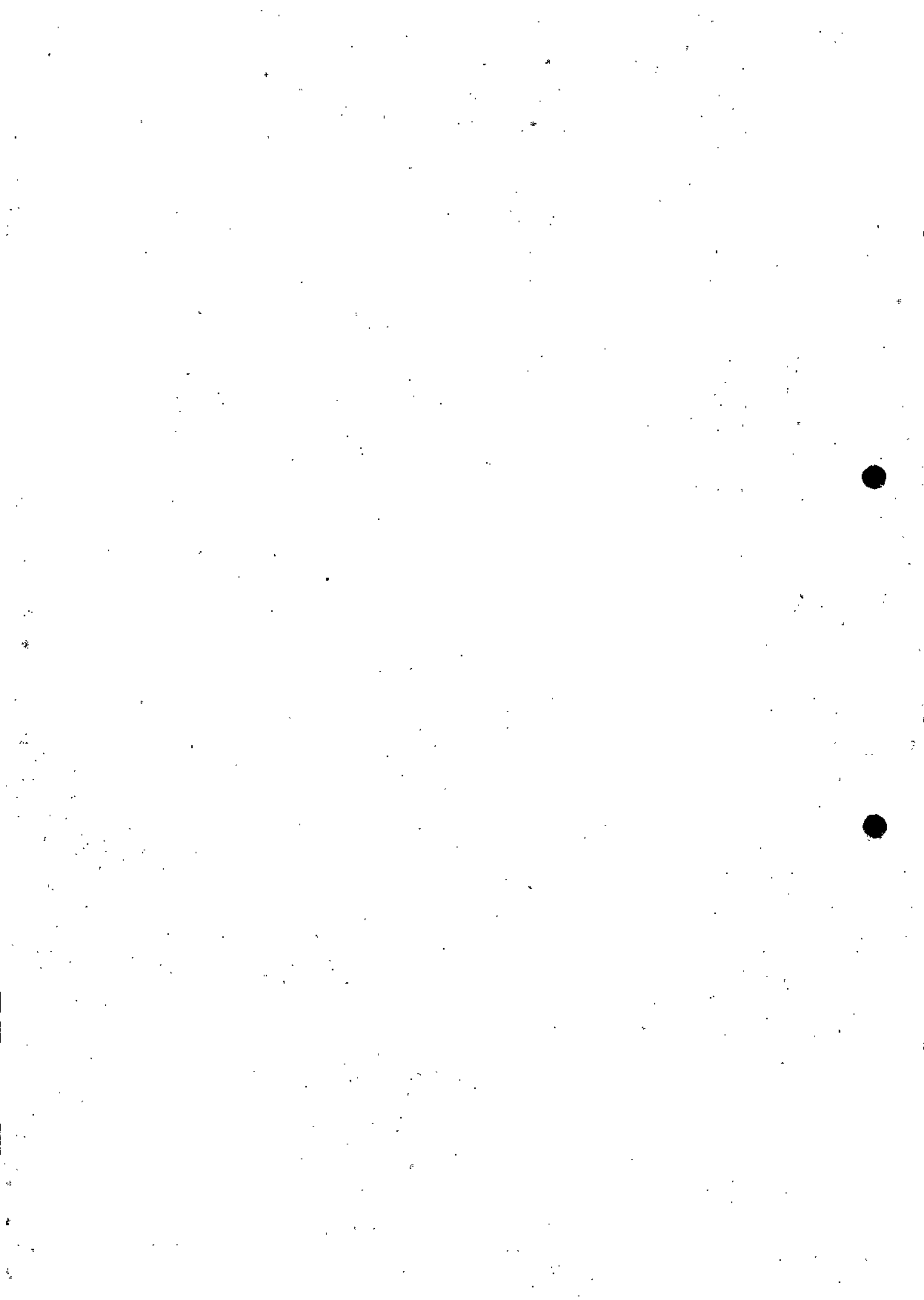
não encontrados tanto nos sedimentos de Abrolhos como na foz do rio Doce anterior ao rompimento. Dessa forma, o Anexo 8 sustenta que a análise de MEV+EDS deve ser realizada de forma contínua sobre o material particulado em suspensão na região de Abrolhos como forma de identificar e mensurar eventuais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

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

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

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

Para este monitoramento, quatro áreas com no mínimo 8m² em cada estação de amostragem (Quadro 11) devem ser delimitadas com pinos de aço inoxidável 316. O estado de saúde das colônias de corais e organismos bentônicos será monitorado dentro destes polígonos, devendo ser quantificada a densidade específica de colônias de corais e a densidade específica de colônias com indícios de deficiências na saúde, além da caracterização dos sintomas apresentados.

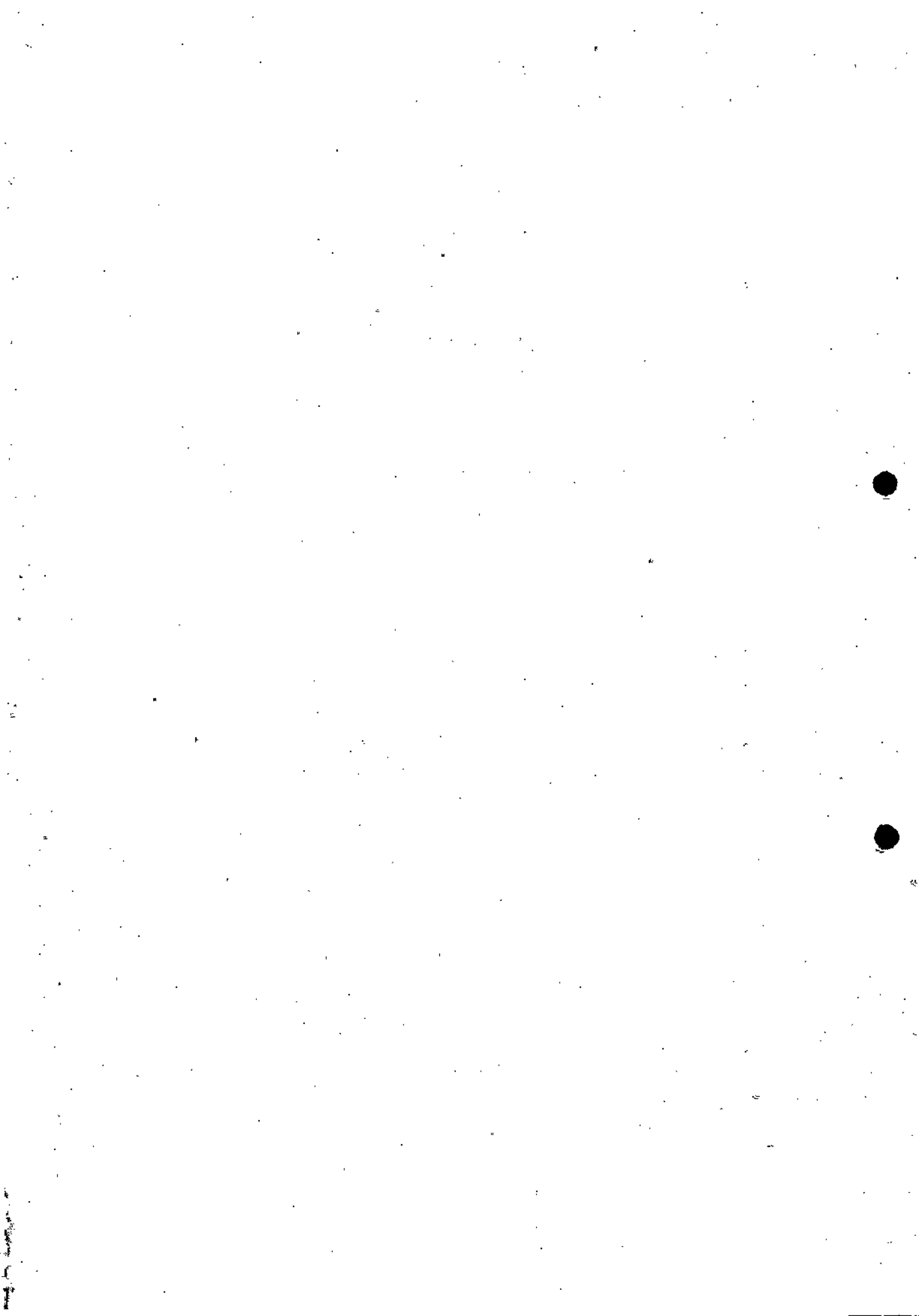


O Anexo 8 define que a caracterização dos sintomas específicos de branqueamento deve usar a técnica do *Coral Watch*, sendo também avaliada a integridade dos tecidos das colônias na área monitorada e verificados na literatura pertinente os sintomas de doenças já conhecidas e descritas para os corais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

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

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

Até o momento não se demonstrou a ocorrência do sedimento oriundo da Barragem de Fundão na região de Abrolhos. O estudo de sedimentação é considerado fundamental para caracterizar a existência de impacto na região de Abrolhos pela presença de elementos associados ao rejeito. Por isso, sugere-se que este estudo preceda os demais monitoramentos previstos neste Anexo e seus resultados balizem ações futuras. Considera-se que a proposta de monitoramento imediato dos recifes não contribui para a eventual associação entre o rompimento da barragem e a saúde dos corais. Sabe-se que o branqueamento de corais é um fenômeno mundial que pode ser associado a fatores muito diversos, incluindo o aumento da temperatura dos oceanos em decorrência do aquecimento global. Por isso, é sugerida a condução dos estudos sobre sedimentação por um período inicial de seis meses, com a devida discussão dos resultados após este período, antes de se proceder ao monitoramento da saúde dos recifes.



4. CRONOGRAMA

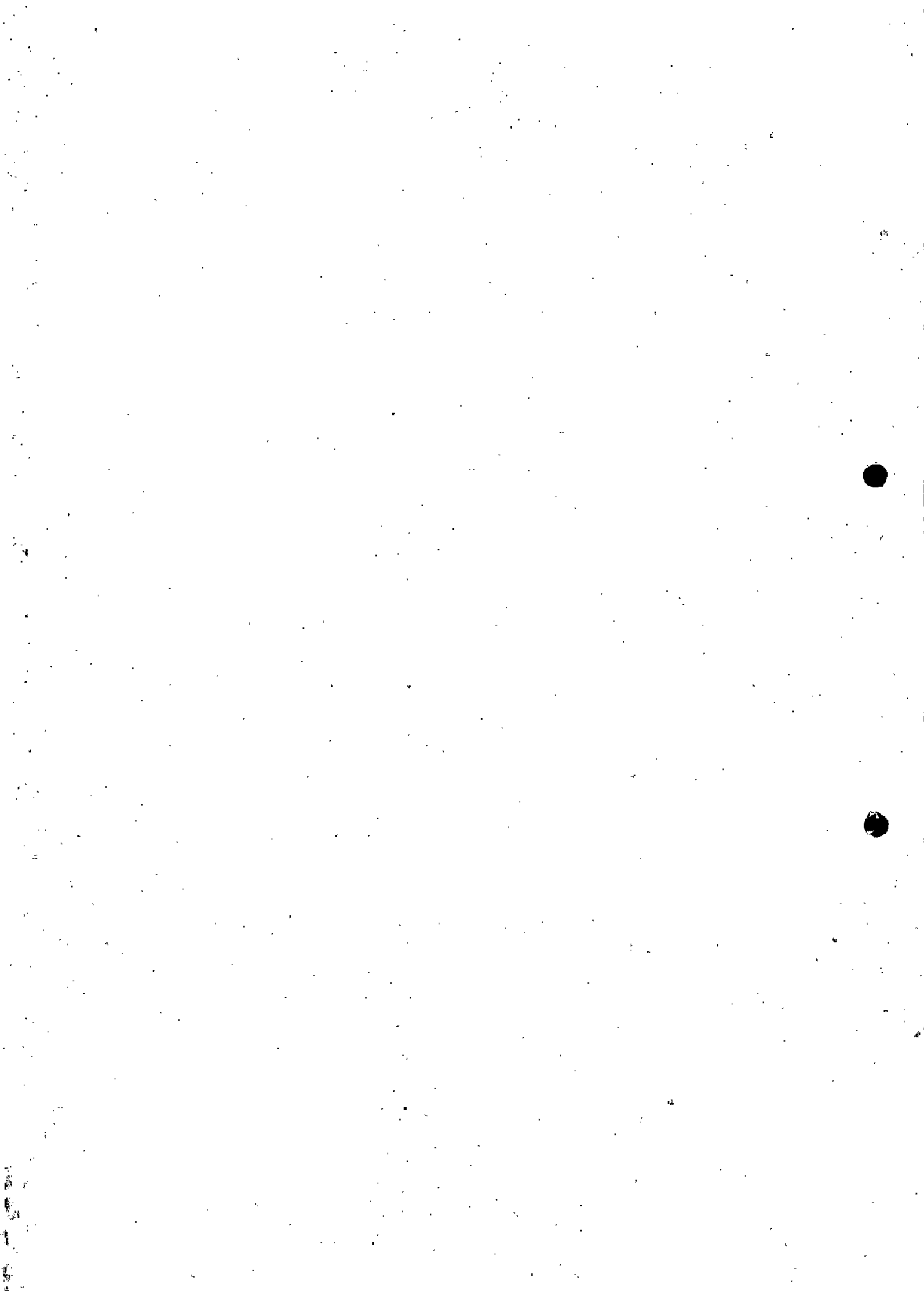
O cronograma é apresentado em arquivo à parte devido às suas dimensões. Optou-se por manter o cronograma com todas as ações em uma única planilha para entendimento das sequências de atividades e entregas de relatórios.

Observa-se que são mantidos de 30 a 45 dias para o processo de mobilização das equipes executoras antes do início dos estudos. A mobilização compreende:

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

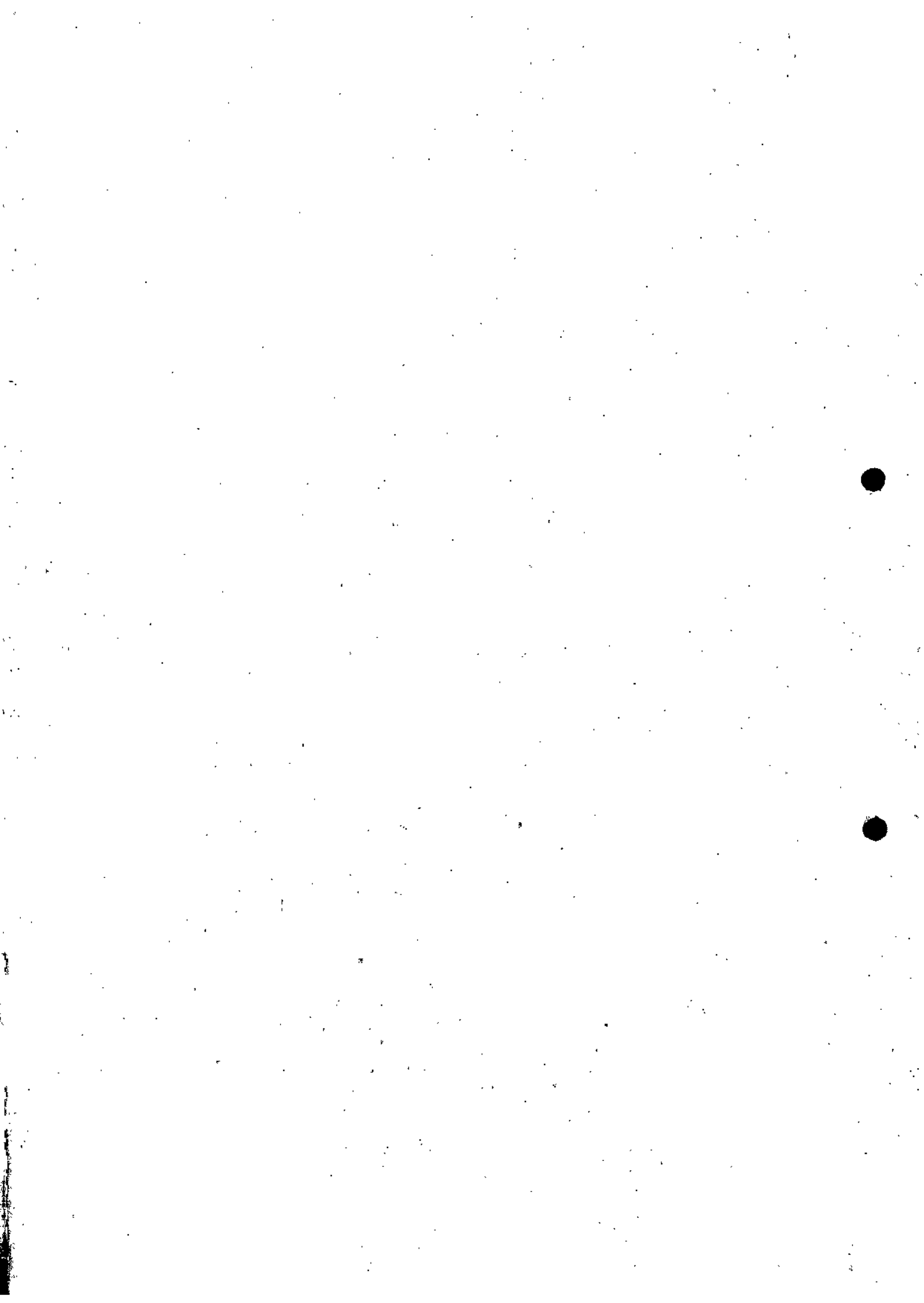
Observa-se, ainda, que os prazos para início dos diversos estudos diferem. O prazo para início de cada estudo é previsto de acordo com os preparativos necessários e informações recolhidas junto aos especialistas nos temas.

De qualquer forma, informa-se que as contratações ainda em andamento (o que exclui a Fundação Pró-Tamar para condução de parte do Anexo 6) serão concluídas ainda em julho de 2017 para início em sequência.



5. REFERÊNCIAS

- ACCORDI, I. A. Pesquisa e conservação de aves em áreas úmidas. In: VON MATTER, S.; STRAUBE, F.C.; ACCORDI, I.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO-JR, F. J. (Org.). **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010.
- AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: PRETOV, B.N. & CSAKI, F. (Eds.). *Second international symposium on information theory*. Budapest, Academiai Kiado, p. 267-281, 1973.
- ALBUJA, L. **Murciélagos del Ecuador**. 2da Edición, Cicetronic Cia. Ltda. Offset Quito, Ecuador, 1999.
- ANTONINI, Y. R. A.; OLIVEIRA, M. L.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, R. Orchid bee fauna responds to habitat complexity on a savanna area (Cerrado) in Brazil. **Sociobiology**, v. 63, p. 819-825, 2016.
- ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. The flowering-visiting bees at the ecological station of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 565-575, 2003.
- ARAUJO, L. S. **Importance of matrix in the community structure of the carpophilus beetles in fragmented landscape**. 2010. Master - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- ÁSTUA, D.; MOURA, R.; GRELE, C. E. V.; Fonseca, M. Influence of Baits, Trap Type, and Position for Small Mammals Capture in a Brazilian Lowland Atlantic Forest. **Bol. Mus. Biol. Mello Leitão**, v. 19, p. 31-44, 2006.
- AUGSPURGER, C. K. Seedling survival of tropical tree species: interactions of dispersal distance, light-gaps, and pathogens. **Ecology**, v. 65, p. 1705-1712, 1984.
- AZEVEDO, PTN; BROWN, GG; BAREA, D; PASINI, A; NUNES, D (2008). Populações de minhocas amostradas usando diferentes métodos de coleta (elétrico, químico e manual manual) em ecossistemas da região de Londrina, Paraná. 3o Encontro Latino-Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetos. 03 a 06/12/2007, Curitiba, PR.
- BECKER, M.; DALPONTE, J. C. **Rastros de mamíferos silvestres brasileiros**. Brasília, DF: Editora da Universidade de Brasília. 1999.
- BESTELMEYER, B.T. & WIENS, J.A (1996). The effects of land use on the structure of ground-foraging ant communities in the Argentine Chaco. **Ecological Applications**, Washington, v. 6, n. 4, p. 1225-1240.
- BIBBY, C.; JONES, M.; MARSDEN, S. **Expedition Field Techniques: Bird Surveys**. London: Geography Outdoors: the centre supporting field research, exploration and outdoor learning, 1998. 134 p.
- BONILLA-GOMEZ, M. A. **Caracterização da Estrutura Espaço-Temporal da Comunidade de Abelhas Euglossinas (Hymenoptera, Apidae) na Hiléia Bahiana**. 1999. 153 p. Ph.D. Thesis - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1999.
- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ÁNDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS, 2008.
- BORGES, P. A. L.; TOMÁS, W. M. **Guia de rastros e outros vestígios de mamíferos do Pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. 139 p.
- BROWN JR., K. S. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. In: MORELLATO, L. P.C. (Ed). **História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Campinas: Editora da UNICAMP/FAPESP, 1992. p. 142-186.



BUCKLAND, S.T., ANDERSON, D.R., BURNHAM, K.P., LAKE, J.L., BORCHERS, D.L. & THOMAS, L. (2001). Introduction to distance sampling: estimating abundance of biological population. Oxford University Press, Oxford, p. 432.

BURNHAM, KP & ANDERSON, D.R. (2002). Model selection and multimodel inference: A practical information and theoretic approach. 2 ed, Springer, p. 488.

CAGLE, F.R. (1939). A System of Marking Turtles for Future Identification. *Copeia*, v. 1939, n. 3, p. 170-173.

CARNEIRO, I.R.A; LIMA, A; MACHADO, R.B.; MAGNUSSON, W.E.; Limitations to the Use of Species-Distribution Models for Environmental-Impact Assessments in the Amazon, *PLOS One*. V 11(1). P 1-17. 2016.

CAVALCANTI, M. C. B. T.; COSTA, C. M. Q.; SILVA, F. A. B.; MOURA, R. C. Preferência alimentar de coleópteros da subfamília Scarabaeinae (Scarabaeidae) capturados em armadilhas "pitfall" no Parque Ecológico João Vasconcelos Sobrinho, Caruaru, PE. In: IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, 2009.

CAVARZERE, V.; COSTA, T. V. V. D.; SILVEIRA, L. F. On the use of 10-minute point counts and 10-species lists for surveying birds in lowland Atlantic Forests in southeastern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 52, n. 28, p. 333-340, 2012.

CETESB, São Paulo, SP. <http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2013/11/6300.pdf>.

CHEIDA, C. C., RODRIGUES, F. H. G. Introdução às técnicas de estudo em campo para mamíferos carnívoros terrestres. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ROSSANEIS, B. K.; FREGONEZI, M. N. (Eds.). *Técnicas de estudos aplicadas aos mamíferos silvestres brasileiros*. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010. 275 p.

CHIARELLO, A. G.; DE AGUIAR, L. M. S.; GREGORIN, R.; HIRSCH, A.; DE MELO, F. R.; PAGLIA, A. P.; RODRIGUES, F. H. G. Mamíferos Ameaçados de Extinção em Minas Gerais. In: DRUMMOND, G. M.; MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; MENDONÇA, M. P.; STEHMANN, J. R. *Listas vermelhas das espécies da Fauna e da Flora ameaçadas de extinção em Minas Gerais*. 2ª ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL – COPAM. 2010. Deliberação Normativa nº 147, de 30 de abril de 2010. Aprova a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna do Estado de Minas Gerais. *Diário do Executivo*, Belo Horizonte/MG, 2010.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL – COPAM. 2010. Deliberação Normativa N° 174, de 30 de abril de 2010. Lista de espécies ameaçadas de extinção da fauna do Estado de Minas Gerais. *Diário do Executivo*, Belo Horizonte/MG, 2010.

COSTA, C.; VANIN, S. A.; CASARI-CHEN, S. A. *Larvas de Coleoptera do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1988. 454p.

COSTA, H. C., BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. *Herpetologia Brasileira*, v. 4, p. 75-93, 2015.

CTBio, 2016. Termo de Referência 4 (Programa de monitoramento da biodiversidade aquática), Anexos 1 (Monitoramento Ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana – MG, em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas) e 6 (Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio Doce, plataforma continental e áreas protegidas). Não publicado.

DE FREITAS, MA; VILLAMARÍN, F; GOMES, P DA S (2015). Protocolo de instalação de parcelas ripárias. Acessado em 19/04/2017 [hps://ppbio.inpa.gov.br/manuais](https://ppbio.inpa.gov.br/manuais).

DEL HOYO, J. et. al. (Eds.) *Handbook of the Birds of the World Alive*. Barcelona: Lynx Edicions. Disponível em: <<http://www.hbw.com/species>>. Acesso em: 2015.



DEVRIES, P. J. **The butterflies of Costa Rica and their natural history - Volume I: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae.** New Jersey: Princeton University Press, 1987.

DEVRIES, P. J.; MURRAY, D.; LANDE, R. Species diversity in vertical, horizontal and temporal dimensions of a fruit-feeding butterfly community in an Ecuadorian rainforest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 343–364, 1997.

DINIZ, PC; LANI, RO (2015). Métodos de amostragem da herpetofauna: algumas dicas e orientações para estudantes e profissionais com pouca ou nenhuma experiência de campo. <http://www3.izabelahendrix.edu.br/ojs/index.php/aic/article/view/813>

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals: a Field Guide.** Chicago, University of Chicago Press, 1997. 290p.

ERIZE, F.; MATA, J. R. R.; RUMBOLL, M. **Birds of South America, Non-Passerines: Rheas to Woodpeckers.** Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 2006. 384 p.

FILIZOLA, HF; GOMES, MAF; SOUZA, MD (2006). Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, SP. [hps://ainfo.cnpa.embrapa.br/digital/bitstream/item/129660/1/2006OL-008.pdf](https://ainfo.cnpa.embrapa.br/digital/bitstream/item/129660/1/2006OL-008.pdf)

FONSECA, G. A. B.; Kierulff, M. C. M. Biology and natural history of Brazilian Atlantic forest mammals. **Bull. Florida State Mus. Biol. Sci.**, v. 34, n. 3, p. 99-152, 1988.

FREITAS, A. V. L.; MARINI-FILHO, O. J. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos lepidópteros ameaçados de extinção.** ICMBio, 2011.

GARDNER, A. L. **Mammals of South America: Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats.** Chicago: The University of Chicago Press, v.1, 2007.

GAUCH, H.G. (1982). **Multivariate Analysis in Community Ecology.** Cambridge University Press, Cambridge, England, p. 298.

GRANTSAU, R. **Guia completo para identificação das Aves do Brasil.** São Carlos/SP: Vento Verde, 2010a. V. 1. 624 p.

GRANTSAU, R. **Guia completo para identificação das Aves do Brasil.** São Carlos/SP: Vento Verde, 2010b. V. 2. 656 p.

GREENBERG, CH, NEARY, D & HARRISARRIS, LD (1994). A comparison of herpetofaunal sampling effectiveness of pitfall, single-ended, and doubleended funnel traps used with dri fences. **J. Herpet.** 28:319-324. <http://dx.doi.org/10.2307/1564530>

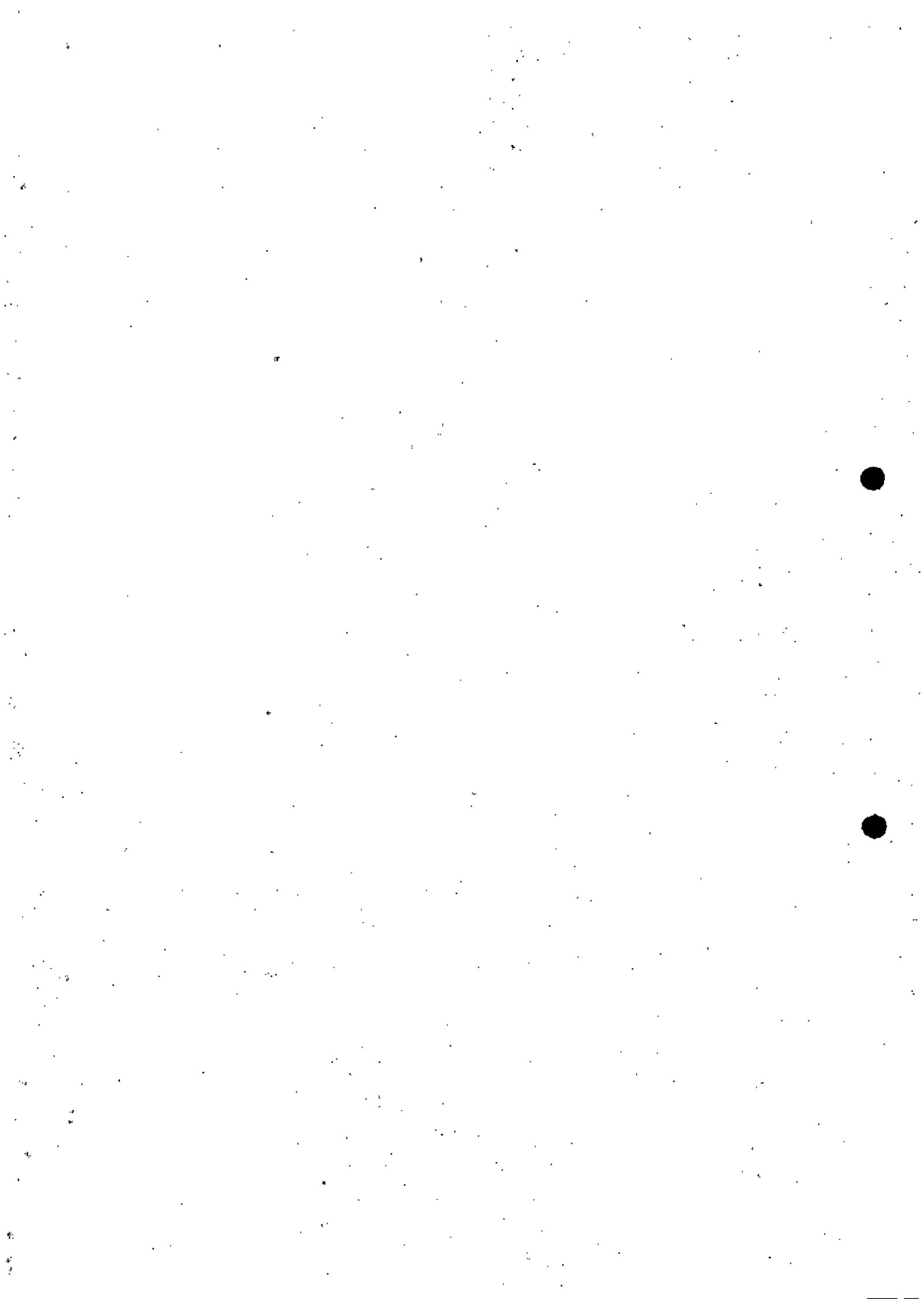
GREGORY, R. D.; GIBBONS, D. W.; DONALD, P. F. BIRD CENSUS AND SURVEY TECHNIQUES. IN: SUTHERLAND, W. J.; NEWTON, I.; GREEN, R. (2004). **Bird ecology and conservation: a handbook of techniques.** Oxford: Oxford University Press, 2004. V. 1. p. 17-56.

GRELLE, C. E. V. Forest Structure and Vertical Stratification of small Mammals in a Secondary Atlantic Forest, Southeastern Brazil. **Journal Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 38, n. 2, p 81-85, 2010.

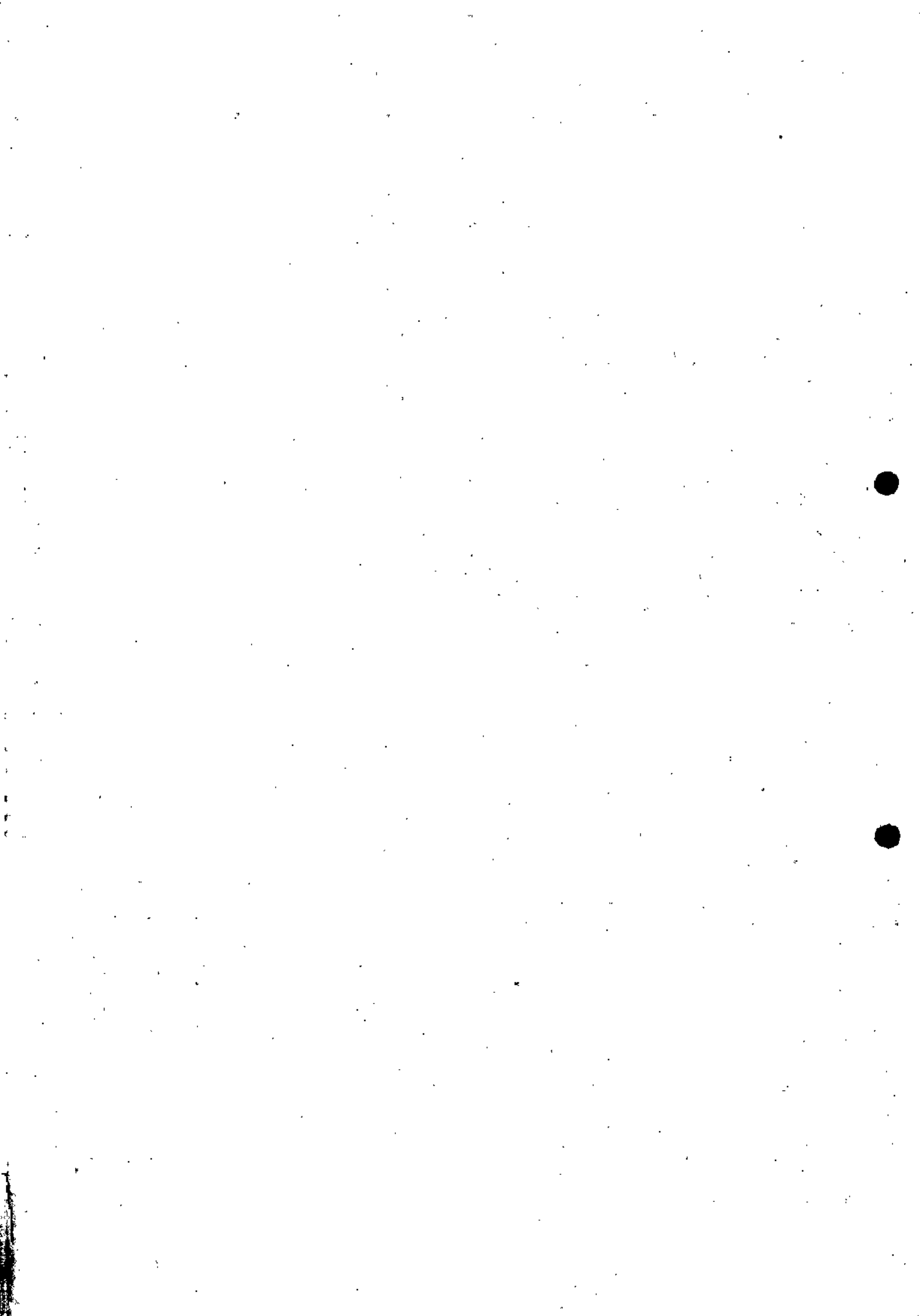
GWYNNE, J. A.; RIDGELY, R. S.; TUDOR, G.; ARGEL, M. **Aves do Brasil: Pantanal e Cerrado.** São Paulo: Editora Horizonte, 2010. V. 1. 322p.

HEIKKILA, M.; KAILA, L.; MUTANEN, M.; PEÑA, C.; WAHLBERG, N. Cretaceous origin and repeated tertiary diversification of the redefined butterflies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, p. 1093–1099, 2011.

HOWE, H. F.; PRIMACK, R. B. Differential seed dispersal by birds of the tree *Casearia nitida* (Flacourtiaceae). **Biotropica**, v. 7, p. 278-283, 1975.



- HUMPHREY, J. W.; HAWES, C.; PEACE, A. J.; FERRIS-KAN, R.; JUKES, M. R. Relationships between ICMBio, 2016b. [hp://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies-dados-insuficientes](http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies-dados-insuficientes). Acessado em 23/03/2017.
- LAAKE, J.L.; BUCKLAND, ST; ANDERSON, DR & BURNHAM, KP . 1994. Distance user's guide. Colorado Cooperave Fish & Wildlife Research Unit, Colorado State University, Fort Collins, CO. 84 p.
- LAMAS, G. Checklist: Part 4A. Hesperioidea-Papilionoidea. In: HEPPNER, J. B. (Ed). **Atlas of Neotropical Lepidoptera 5A**. Gainesville: Association for Tropical Lepidoptera, 2004, 439 p.
- LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D. Species diversity of bats (mammalia: chiroptera) in Iwokrama Forest, Guyana, and the Guianan subregion: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 10, p. 613-657, 2001.
- LOPES, L. E.; FERNANDES, A. M.; MARINI, M. Â. Diet of some Atlantic Forest birds. **Ararajuba**, v. 13, n. 1, p. 95-103, 2005.
- MACKENZIE, DI, & ROYLE, JA (2005). Designing occupancy studies: general advice and allocang survey effort. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, p. 1105-1114.
- MACKENZIE, DI, NICHOLS, J, ROYLE, J, POLLOCK, K, BAILEY, L & HINES, J (2005). Occupancy estimation and modeling: Inferring patterns and dynamics of species occurrence. Elsevier Publishing.
- MACKINNON, S.; PHILLIPS, K. **A Field Guide to the Birds of Borneo, Sumatra, Java and Bali**. Oxford: Oxford University Press, 1993.
- MAGNUSSON, WE, LIMA, AP; LUIZÃO, R; LUIZÃO, F; COSTA, FRC; CASTILHO, HO, CV. & VF KINUPP (2005). RAPELD: a modification of the Gentry method for biodiversity surveys in long-term ecological research sites. **Biota Neotropica**, 5(2):1-6.
- MARINORI, R. C.; GANHO, N. G.; MONNÉ, M. L.; MERMUDES, J. R. M. **Hábitos Alimentares em Coleoptera**. Editora Holos, 2001. 64 p.
- MICHENER, C. D. 2000. The Bees of the World. Baltimore and London, The John Hopkins University Press, 913 p.
- MOSHER, J. A.; FULLER, M. R.; KOPENY, M. Surveying woodland raptors by broadcast of conspecific vocalizations. **Journal of Field Ornithology**, v. 61, n. 4, p. 453-461, 1990.
- MOTTA JÚNIOR, J. C. Estrutura trófica e composição da avifauna de três habitats terrestres na região central do Estado de São Paulo. **Ararajuba**, v. 1, p. 65-71, 1990.
- MOURA, R. T. M. **Análise Comparativa da Estrutura de Comunidades de Pequenos Mamíferos em Remanescente de Mata Atlântica e em Plantio de Cacau em Sistema de Cabruca no sul da Bahia**. 1999. Dissertação de mestrado, PG-ECMVS, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- NAUWELAERTS, S.; COECK, J.; AERTS, P. Visual implant elastomer as a method for marking adult anurans. **Herpetological Review**, v. 31, p. 154-155, 2000.
- O'DEA, N. O.; WATSON, J. E. M.; WHITTAKER, R. J. Rapid assessment in conservation research: a critique of avifaunal assessment techniques illustrated by Ecuadorian and Madagascan case study data. **Diversity and Distributions**, n.10, p. 55-63, 2004.
- OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. **Guia de felinos do Brasil**. São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros, Sociedade de Zoológicos do Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 2005. 80p.
- PAGLIA, A. P.; DA FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. DA C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. **Lista Anotada dos Mamíferos do**



Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição/2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, n. 6. Arlington: Conservation International., 2012. 76 p.

PARKER, T. A. On the use of tape recorders in avifaunal surveys. **The Auk**, v. 108, p. 443-444, 1991.

PEÑA, M. R.; RUMBOLL, M. **Birds of Southern South America and Antarctica.** Princeton/New Jersey: Princeton University Press, 1998. 304p.

PENNEY, K.M.; GIANOPULOS, K.D.; MCCOY, E.D.; MUSHINSKY, H.R. The visible implant elastomer marking technique in use for small reptiles. **Herpetological Review**, v. 32, p. 236-241, 2001.

PHILLIPS, O. L. The changing ecology of tropical forests. **Biodiversity and Conservation**, v. 6., p. 291-311, 1997.

POULSEN, B. O.; KRABBE, N. Avifaunal diversity of five high altitude cloud forests on the Andean western slope of Ecuador: testing a rapid assessment method. **Journal of Biogeography**, v. 25, n. 1, p. 83-93, 1998.

REIS, N. R.; A. L. PERACCHI; W. A. PEDRO E I. P. LIMA (EDS.). 2011. **Mamíferos do Brasil.** Universidade Estadual de Londrina: Londrina, PR.

RIBON, R. Amostragem de Aves pelo método de listas de Mackinnon. In: Matter, S. V.; Straube, F. C.; Accordi, I.; Piacentini, V.; Cândido-Jr, J. F. (Orgs.). **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento.** Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 33-44

RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. **The Birds of South America: The Suboscine Passerines.** Austin (TX): University of Texas Press, 1994. V 2. 940p.

ROOPER, C. N. Underwater video sleds: versatile and cost effective tools for habitat mapping. In: Reynolds, J. R.; Greene, H. G. (Eds.). **Marine Habitat Mapping Technology for Alaska: what is it, and why do managers need it?** Fairbanks: Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska Fairbanks, 2008. p. 99-107.

ROOS, A. L. Capturando aves. In: In: Matter, S. V.; Straube, F. C.; Accordi, I.; Piacentini, V.; Cândido-Jr, J. F. (Orgs.). **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento.** Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 79-104.

ROUBIK, D.W. **Ecology and natural history of tropical bees.** New York: Cambridge University Press, 1989. 514 p.

SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. (1967). Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process VI. *Trigona (Tetragona) clavipes*. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Univer* **16 (2):** 292-313 [292, 312] (behavior, provisioning, oviposition process, citation, comparative notes) boni

SANTOS, APM; DUMAS, LL; JARDIM, GA; SILVA, ALR & NESSIMIAN, JL. (2015). Brazilian Caddisflies: Checklists and Bibliography. <https://sites.google.com/site/braziliancaddisflies>

SANTOS, E; VARGAS, GR; MELLO FILHO, NR; GARDNER, GB (2016). Comparação entre diferentes métodos de coleta de minhocas em dois diferentes sistemas florestais. **Scientia Vitae** 3: 34-40.

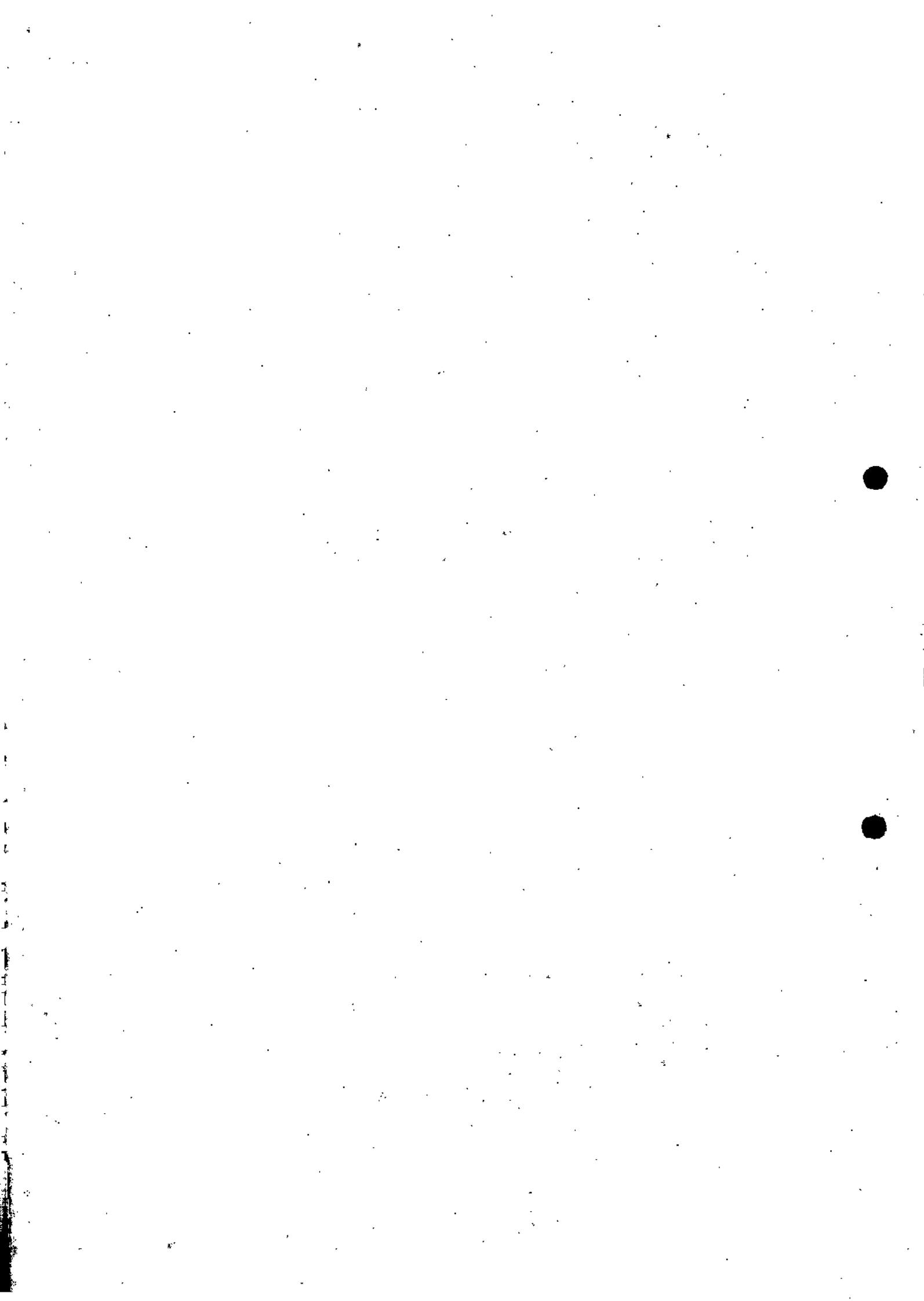
SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LANGONE, J.; GARCIA, P. C. A. Brazilian amphibians: list of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, p. 37-48, 2014.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

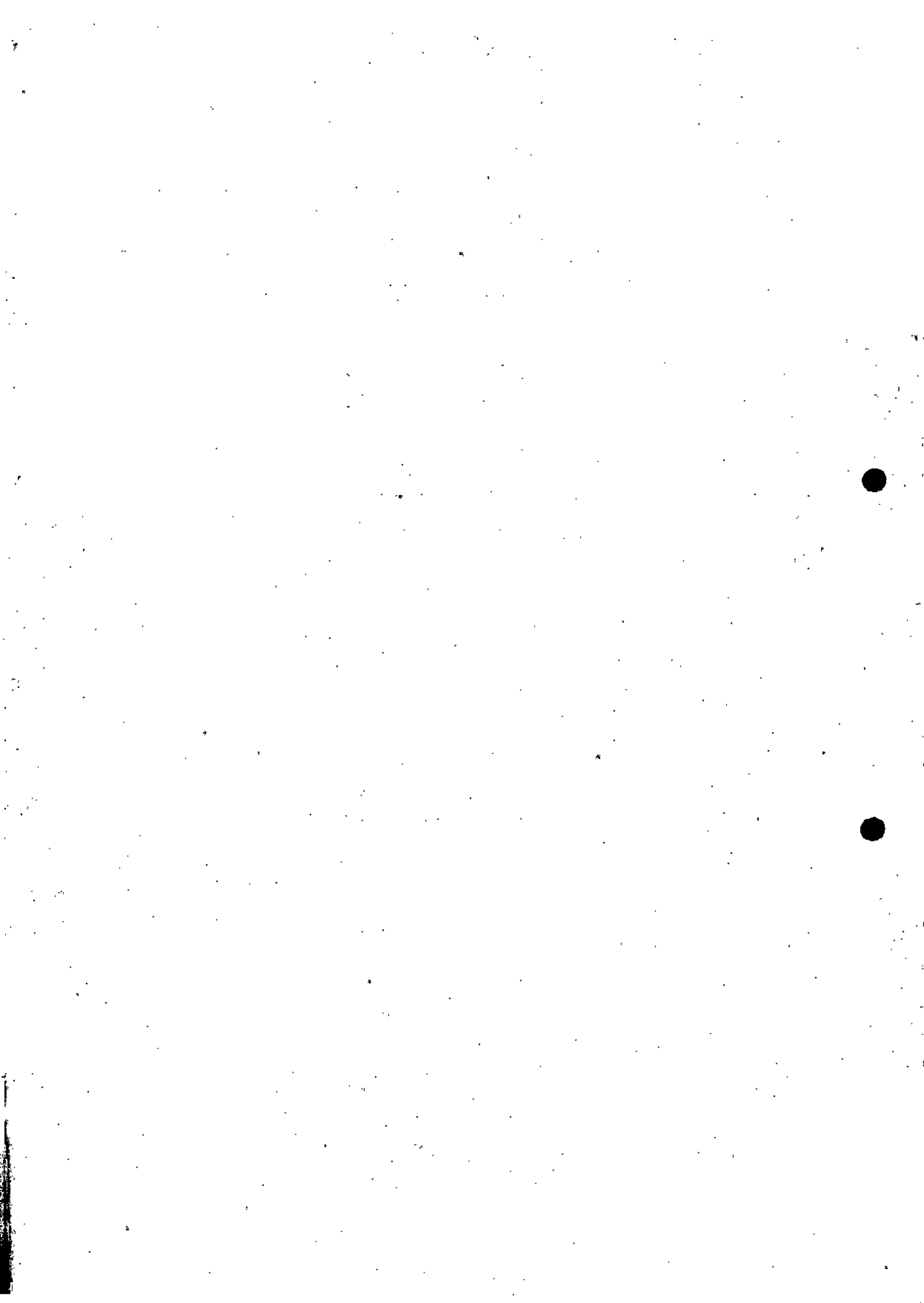
SILVA, FC (2009). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa, Brasília, DF. [hp://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00083136.pdf](http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00083136.pdf) Silva, ER; Salles, FF. Ephemeroptera. In:

SILVA, J. M. C. Birds of the Cerrado region, South America. **Steenstrupia**, v. 21, p. 69-92, 1995.

SILVEIRA, L. F.; BEISIEGEL, B. M.; CURCIO, F. F.; VALDUJO, P. H.; DIXO, M.; VERDADE, V. K.;

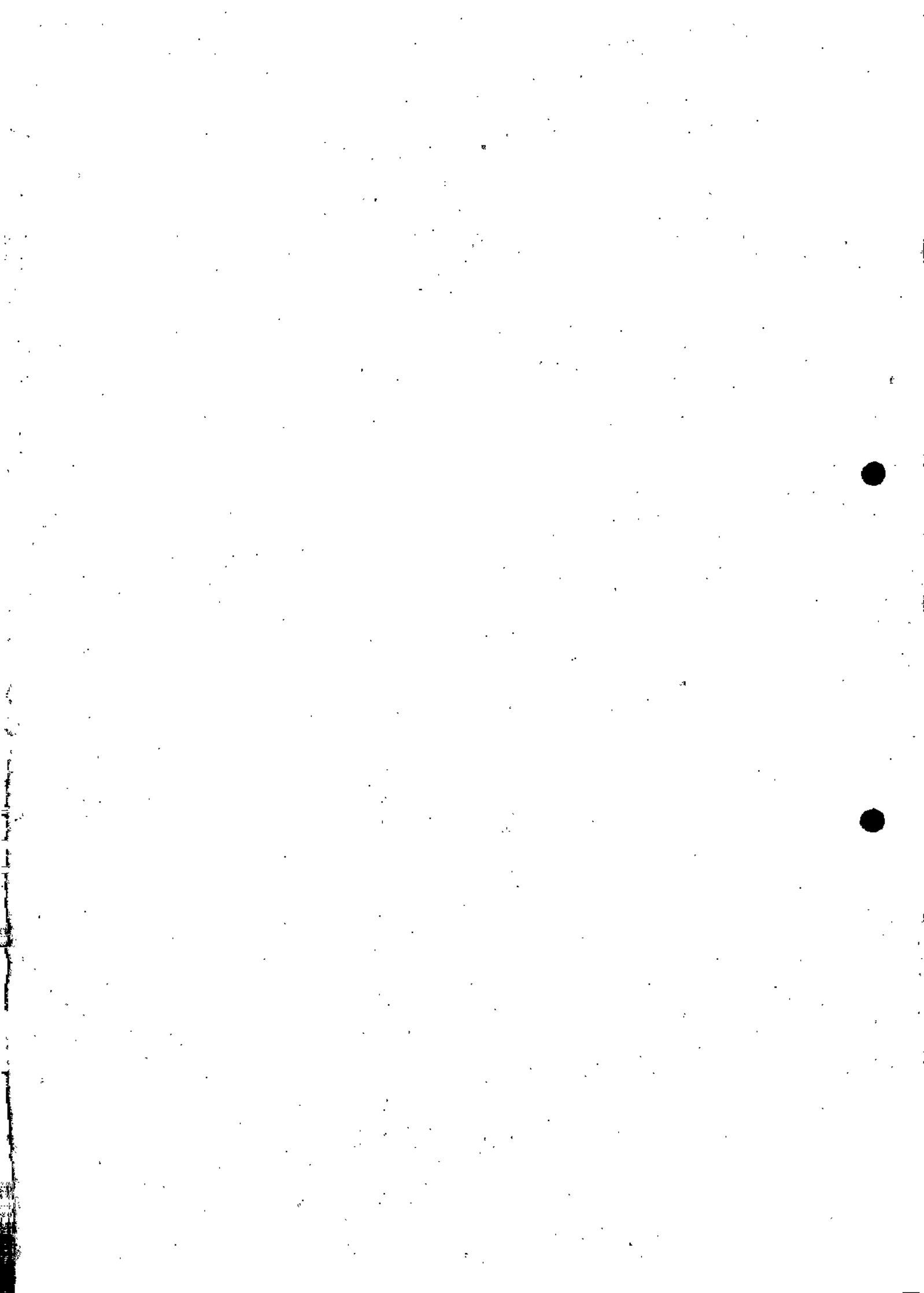


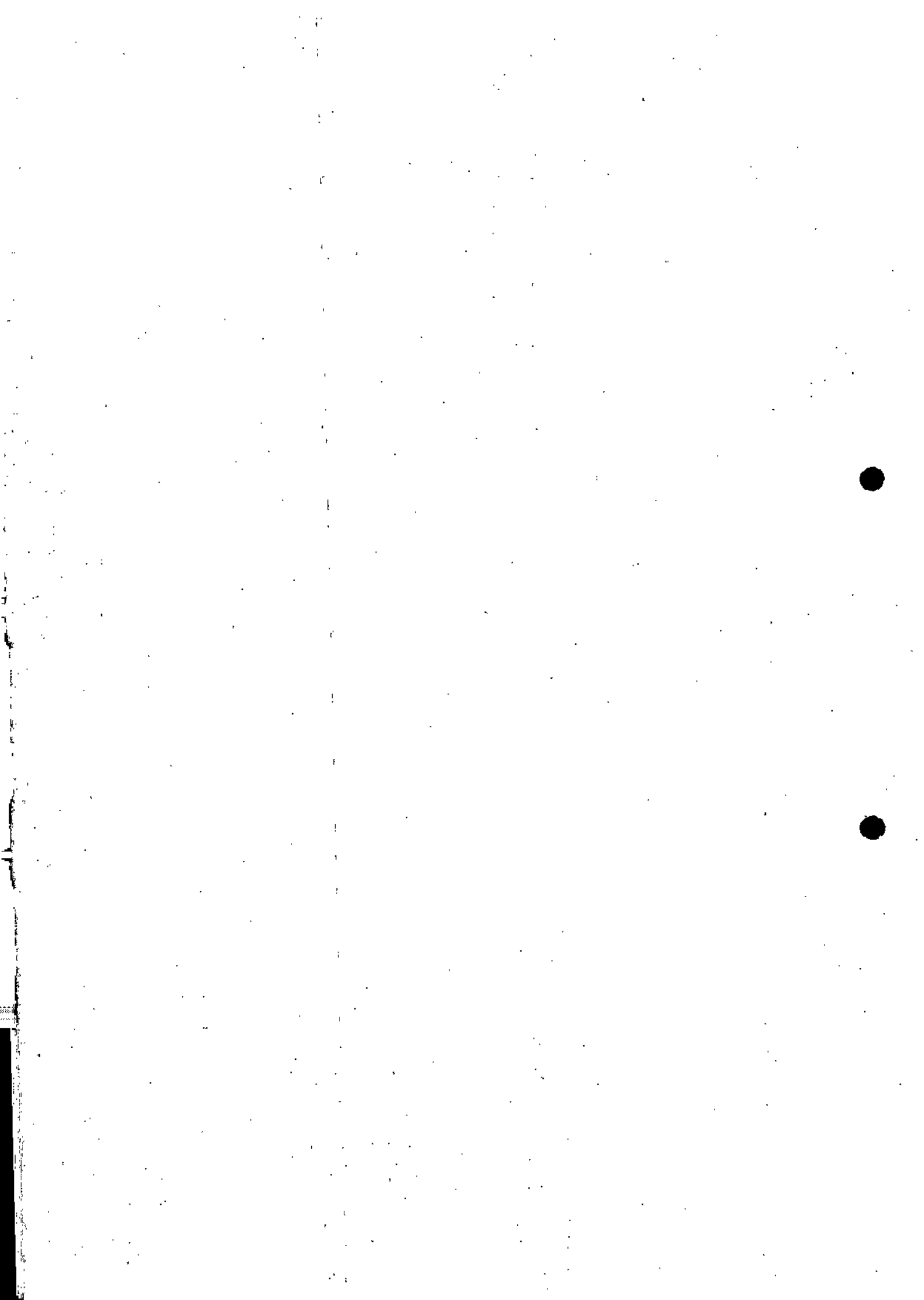
- MATTOX, G. M. T.; CUNNINGHAM, P. T. M. Para que servem os inventários de fauna?. **Estudos avançados**, v. 24, p. 173-207, 2010.
- SIMMONS, N. B.; VOSS, R. S. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna. Part I. **Bats. Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 237, p. 1-219, 1998.
- SLIPÍNSKI, S. A.; LESCHEN, R. A. B.; LAWRENCE, J. F. Order Coleoptera Linnaeus, 1758. In: ZHANG, Z. Q. (Eds). *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness* **Zootaxa**, n. 3148, p. 203-208, 2001.
- STALLINGS, J. R. Small mammal inventories in an Eastern Brazilian Park. **Bulletin. Florida. State Museum. Biol. Sci.**, v. 34, p. 153-200, 1989.
- STOTZ, D. F.; FITZPATRICK, J. W.; PARKER III, T. A.; MOSKOVITS, D. K. **Neotropical Birds: ecology and conservation**. Chicago: University of Chicago Press, 1996. 478p.
- STRAUBE, F. C.; BIANCONI, G. V. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com a utilização de redes-de-neblina. **Chiroptera Neotropical**, v. 8, p. 150-152, 2002.
- TELINO-JÚNIOR, W. R.; DIAS, M. M.; AZEVEDO-JUNIOR, S. M.; LYRA-NEVES, R. M.; LARRAZÁBAL, M. E. L. Trophic structure of bird community of Reserva Estadual de Gurjaú, Zona da Mata Sul, Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 962-673, 2005.
- UEHARA-PRADO, M.; BROWN JR, K. S.; FREITAS, A. V. L. Species richness, composition and abundance of fruit-feeding butterflies in the Brazilian Atlantic Forest: comparison between a fragmented and a continuous landscape. **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, p. 43-54, 2007.
- UEHARA-PRADO, M.; RIBEIRO, D. B. Borboletas em Floresta Atlântica: métodos de amostragem e inventário de espécies na Serra do Itapeti. In: MORINI, M. S. C.; MIRANDA, V. P. O. (Orgs). **Serra do Itapeti: aspectos históricos, sociais e naturalísticos**. Bauru: Canal6, 2012. p 167-186.
- UNEP-WCMC (Comps.) (2015). The Checklist of CITES Species Website. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland. Compiled by UNEP-WCMC, Cambridge, UK. Available at:<http://checklist.cites.org>. Acessado em 23/03/2017.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency (2011). Method 3051a – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. 1998. Disponível em: <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/3051a.pdf> Acesso em 18 de ag. 2011.
- VAN PERLO, B. **A field guide to the Birds of Brazil**. New York: Oxford University Press, 2009.
- VIELLIARD, J. M. E.; ALMEIDA, M. E. C.; ANJOS, L.; SILVA, W. R. Levantamento quantitativo por pontos de escuta e o Índice Pontual de Abundância (IPA). In: MATTER, S. V.; STRAUBE, F. C.; ACCORDI, I.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO-JR, J. F. **Ornitologia e Conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 47-60.
- VIELLIARD, J. M. E.; ALMEIDA, M. E.; ANJOS, L.; SILVA, W. R. Levantamento quantitativo por pontos de escuta e o Índice Pontual de Abundância (IPA) In: MATTER, S. V.; STRAUBE, F. C.; ACCORDI, I.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO-JR, J. F. **Ornitologia e Conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 47-60.
- VIELLIARD, J. M. E.; SILVA, W. R. **Nova metodologia de levantamento quantitativo e primeiros resultados no interior do estado de São Paulo**. Anais do IV Encontro Nacional de Anilhadores de Aves. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1990.
- VIELLIARD, J. M. E.; SILVA, W. R. **Nova metodologia de levantamento quantitativo da avifauna e primeiros resultados no interior do Estado de São Paulo**. Anais: IV Encontro Nacional de Anilhadores de Aves. Brasília, 1990.
- VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. **Chave para a determinação de quirópteros brasileiros**. São José do Rio Preto: Francal, 1973. 72p.



WALDEZ, F., MENIN, M. & VOGT, R.C. (2013) Diversity of amphibians and Squamata reptilians from lower Purus River Basin, Central Amazonia, Brazil. *Biota Neotrop.* 13(1): 300-316.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference.** 3rd Ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. 2142 p.

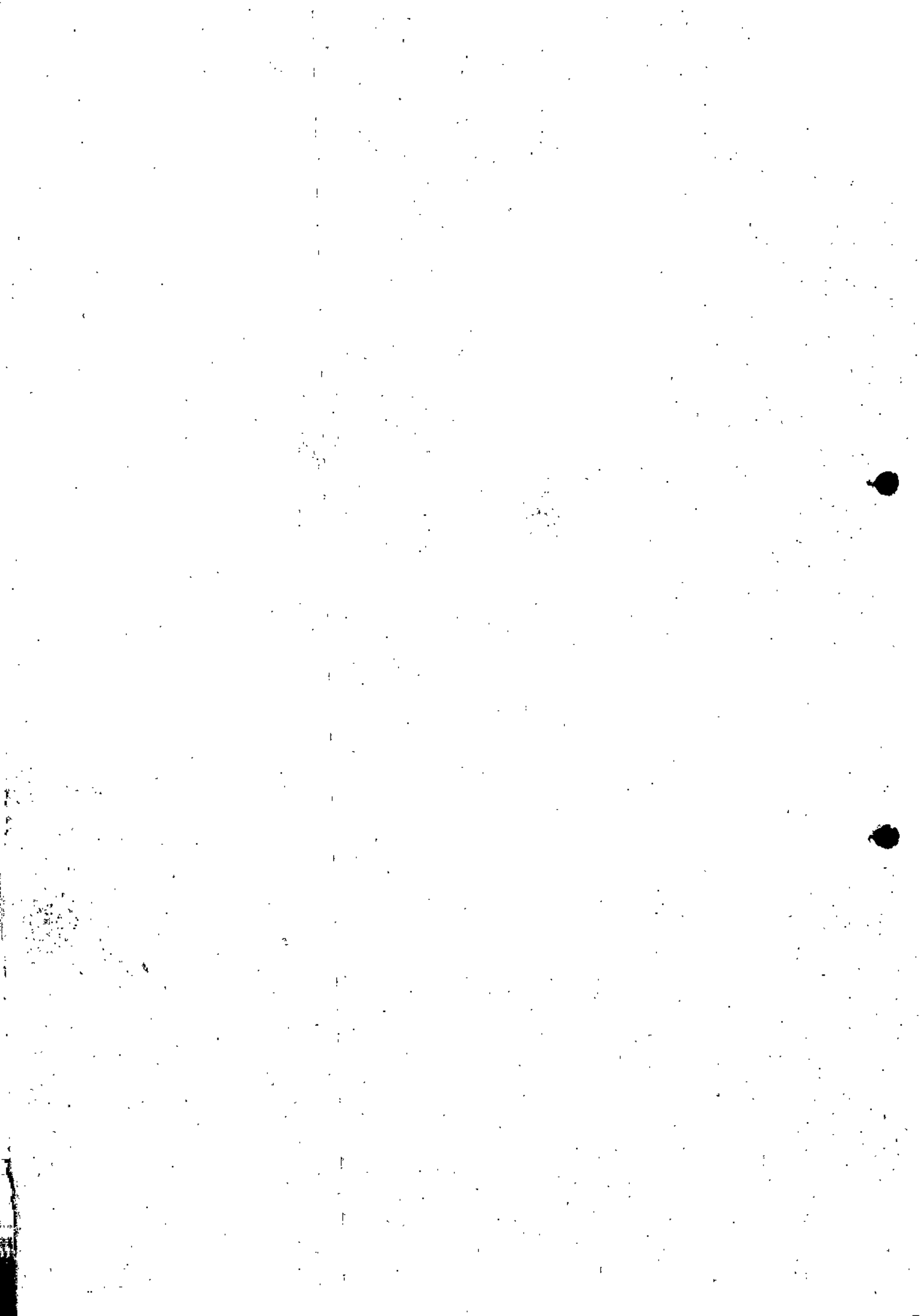




Atividades	ano 1												ano 2												ano 3 ao 6				
	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8	Mês 9	Mês 10	Mês 11	Mês 12	Mês 13	Mês 14	Mês 15	Mês 16	Mês 17	Mês 18	Mês 19	Mês 20	Mês 21	Mês 22	Mês 23	Mês 24	ano 3	ano 4	ano 5	ano 6	
Anexo 7 - dados para monitoramento de Leishmanias																													
Coleta de dados																													
Coleta de dados - Parasitologia																													
Análise de dados																													
Elaboração Relatório referente ao Anexo 7																													
Anexo 8 - Monitoramento de sedimentação em Albufeira																													
Coleta de dados - Turbidez, material particulado e sedimentação																													
Coleta de dados - Reclive do canal																													
Análise de dados																													
Elaboração Relatório referente ao Anexo 8																													
Workshop para apresentação dos resultados e discussão																													

Premissas

Anexo 7. Coleta de dados será trimestral no 2º ano de amostragem, semestral no 3º e 4º anos e mensal no 5º ano.





1. Objeto

2. Fundamento legal

3. Procedimento

4. Conclusão

5. Assinatura

6. Data

7. Local

8. Observações

9. Encargos

10. Anexos

11. Referências

12. Informações

13. Considerações

14. Conclusões

15. Assinaturas

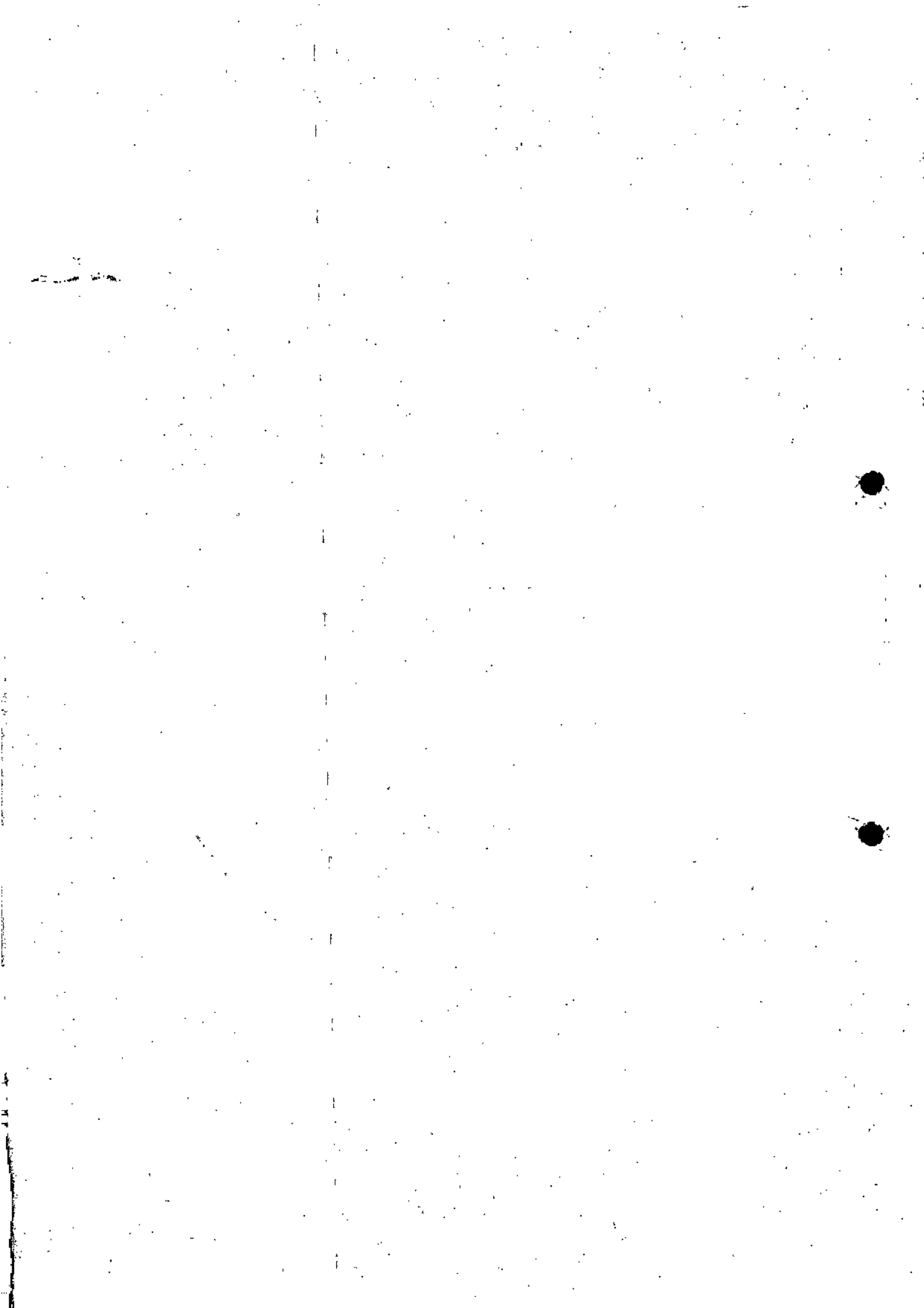
16. Data

17. Local

18. Observações

19. Encargos

20. Anexos



CD ANEXO

