

ESTUDO DA ICTIOFAUNA DA BACIA DO RIO DOCE APÓS O ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITO DA SAMARCO

➤ METAS E ATIVIDADES GERAIS

#	Atividade	Início	Término
1	Assinatura do projeto, liberação de recursos, compra de materiais de consumo e equipamentos	Outubro 2019	Novembro 2019
2	Contratação e treinamento da equipe na coleta das diversas amostras de peixes e nos dados ambientais do IIB.	1 de Novembro 2019	30 de Novembro 2019
3	Coleta dos 15 primeiros pontos da campanha chuvosa.	1 de Dezembro 2019	30 de Janeiro 2020
4	Envio de relatório parcial para RENOVA com o andamento do projeto 1/4.		10 de Fevereiro 2020
5	Apresentação de relatório parcial com o andamento do projeto 1/4 para.CTBio		21 de Fevereiro 2020
6	Envio de amostras para análise e de planilha de dados	1 de Fevereiro 2020	10 Fevereiro 2020
7	Coleta dos 30 primeiros pontos da campanha chuvosa.	1 de Fevereiro 2020	30 de Fevereiro 2020
8	Envio de amostras para análise e de planilha de dados	1 de Março 2020	10 de Março 2019
9	Término da coleta dos 40 pontos da campanha chuvosa.	1 de Março 2020	30 de Março 2020
10	Envio de relatório parcial para RENOVA com o andamento do projeto 2/4.		30 Maio 2020
11	Apresentação de relatório parcial com o andamento do projeto 2/4 para.CTBio		15 Junho 2020
12	Envio de amostras para análise e de planilha de dados	10 de Maio 2020	20 de Maio 2020
13	Coleta dos 15 primeiros pontos da campanha seca.	1 de Junho 2020	30 de Junho 2020
14	Envio de amostras para análise e de planilha de dados	1 de Julho 2020	10 de Julho 2020
15	Envio de relatório parcial para RENOVA com o andamento do projeto 3/4.		30 de Julho 2020
16	Apresentação de relatório parcial com o andamento do projeto 3/4 para.CTBio		15 de Agosto 2020
17	Coleta dos 30 primeiros pontos da campanha seca.	1 de Julho 2020	30 de Julho 2020
18	Envio de amostras para análise e de planilha de dados	1 de Agosto 2020	10 de Agosto 2020
19	Término da coleta dos 40 pontos da campanha seca.	1 de Setembro 2020	30 de Setembro 2020
20	Envio de amostras para análise e de planilha de dados	1 de Outubro 2020	30 de Outubro 2020
21	Envio de relatório FINAL para RENOVA com os resultados do projeto 4/4.		28 de Fevereiro 2021
22	Apresentação de relatório FINAL com o resultados do projeto 4/4 para.CTBio		15 de Março 2021

SUBPROJETO I

ÍNDICE DE INTEGRIDADE BIÓTICA DA BACIA DO RIO DOCE APÓS O ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITOS DE MINÉRIO DE FERRO “FUNDÃO”

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Abdala Dergam dos Santos	Coordenador do Projeto	UFV
Paulo dos Santos Pompeu	Desenvolvimento do projeto	UFLA
Carlos Frankl Sperber	Auxílio no desempenho experimental	UFV
Frederico Fernandes Ferreira	Coordenação das equipes de campo	UFV

2. ESCOPO

Em 5 de novembro de 2015, o Brasil sofreu seu pior desastre ambiental quando o rompimento da barragem “Fundão” descarregou 62 milhões de toneladas de minério de ferro no canal do rio Doce, uma das drenagens mais importantes para o fornecimento de água e meios de subsistência para a Mata Atlântica. Houve perdas irreversíveis de biodiversidade e funcionalidades do ecossistema. Toneladas de peixes morreram imediatamente. A lama de rejeitos percorreu os 663 km do rio Doce até o oceano Atlântico, expandindo os impactos a frágil e diversificada região estuarina e costeira. Um evento destas proporções tem impactos ambientais que são muito complexos para serem monitorados apenas sob um ponto de vista puramente físico. Para estudos sobre efeitos crípticos ou prolongados dos impactos antropogênicos sobre os ecossistemas, é aconselhável tecnologias de diagnóstico para propor futuros esforços de restauração para o estado anterior do ecossistema. O Índice de Integridade Biótica (IIB) é um indicador válido da saúde geral dos sistemas aquáticos, e baseia-se no pressuposto de que existe uma relação previsível entre a estrutura da comunidade de peixes e a estrutura física, condições químicas e biológicas dos corpos de água. O IIB apresenta predições gerais, mas deve ser adaptado para as condições ecológico-evolutivas de cada bacia. Nesta proposta, iremos desenvolver um IIB para ser utilizado como ferramenta para avaliar e monitorar os habitats aquáticos da bacia do rio Doce. Vamos utilizar os habitats e comunidades de peixes de tributários que não foram afetados pelo impacto do rejeito, como referência. Após este estudo, esperamos propor soluções concretas para desenvolver planos de ação que contribuam para a conservação e restauração de processos ecológicos-chave, visando mitigar os impactos causados pelo rejeito, nas comunidades de peixes.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Elaborar Índice de Integridade Biótica para a Bacia do Rio Doce, baseado nas comunidades de peixes.

Objetivos Específicos

1. Criar ferramenta de avaliação de integridade biótica de trechos de rio da bacia do rio Doce, tendo os peixes como organismos bioindicadores.
2. Definir quais as relações entre a estrutura da comunidade de peixes e a estrutura física, condições químicas e biológicas dos corpos de água no rio Doce.
3. Caracterizar e comparar a integridade de diferentes trechos de rio da bacia do rio Doce.
4. Construir um plano de pesquisa de longo prazo para a recuperação do rio Doce e conservação dos locais prioritários para a recuperação da bacia.
5. Propor medidas ambientais que favoreçam a manutenção dos processos ecológicos e evolutivos que moldaram as comunidades de peixes da bacia do Rio Doce.

4. PRODUTOS

#	Produto	Data de Entrega	Responsável
1	RELATÓRIO DO SUBPROJETO I	1º - 30/05/2020 2º - 20/02/2021	Frederico Fernandes Ferreira
2	Envio de relatório parcial para RENOVA com o andamento do projeto 1/4.	10 de Fevereiro 2020	Frederico Fernandes Ferreira
	Apresentação de relatório parcial com o andamento do projeto 1/4 para.CTBio	21 de Fevereiro 2020	Frederico Fernandes Ferreira
3	Envio de relatório parcial para RENOVA com o andamento do projeto 2/4.	30 Maio 2020	Frederico Fernandes Ferreira
	Apresentação de relatório parcial com o andamento do projeto 2/4 para.CTBio	15 Junho 2020	Frederico Fernandes Ferreira
4	Envio de relatório parcial para RENOVA com o andamento do projeto 3/4.	30 de Julho 2020	Frederico Fernandes Ferreira
	Apresentação de relatório parcial com o andamento do projeto 3/4 para.CTBio	15 de Agosto 2020	Frederico Fernandes Ferreira
6	Envio de relatório FINAL para RENOVA com os resultados do projeto 4/4.	28 Fevereiro 2021	Jorge Abdala Dergam dos Santos
7	Apresentação de relatório FINAL com os resultados do projeto 4/4 para.CTBio	15 de Março 2021	Jorge Abdala Dergam dos Santos

5. METODOLOGIA

Desenho amostral

Ao longo da bacia do rio Doce, selecionamos 40 pontos amostrais que incluirão, além da calha principal do rio, alguns de seus principais afluentes: rios Piranga, do Carmo, Matipó, Suaçuí Grande, Caratinga, Santo Antônio, Manhuaçu, Piracicaba e Baixo Guandu (ver ANEXO I: Apresentação dos pontos de amostragem propostos para essa proposta). A amostragem será realizada por duas equipes, cada uma composta de quatro pessoas sendo pelo menos 2 biólogos, um auxiliar de campo e um pescador da região. Cada equipe irá coletar 20 dos 40 pontos na estação seca e 20 na estação chuvosa durante 16 meses, totalizando os 40 pontos amostrados pelas duas equipes em ambas estações. Desses 40 pontos, 15 serão em áreas afetadas pelo rejeito e 25 serão em áreas não afetadas (pontos de referência). Realizaremos amostragens de peixes e caracterização do habitat físico na estação seca (meses de abril a setembro) e a reamostragem de peixes na estação chuvosa (outubro a março), totalizando 2 (duas) amostragens durante a vigência desta proposta. Em cada ponto, definiremos um trecho de amostragem de 1 km e acordo com o protocolo proposto por Peck et al. (2006) e modificado para rios tropicais por Callisto et al. (2014). Cada trecho será subdividido em 11 seções transversais (denominadas A a K, a jusante / montante), resultando em 10 seções de 100 metros (ver ANEXO II Esquema dos transectos amostrados em cada trecho de curso d'água estudado, para a mensuração das variáveis ambientais e de habitat que comporão o Índice de Integridade Biótica).

Amostragem

A amostragem será realizada por uma equipe composta de quatro pessoas sendo pelo menos 2 biólogos, um auxiliar de campo e um pescador da região. A coleta de peixes será realizada com redes de emalhar de diferentes tamanhos (15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 e 80 mm entre nós adjacentes). Em cada estação amostral serão armados dois conjuntos de redes, duas redes de cada tamanho de malha. As redes serão armadas à tarde e serão revisadas durante a noite, para impedir a morte de espécimes emalhados, sendo retiradas no início da manhã, permanecendo na coluna d'água por aproximadamente 12 horas. Além das redes de espera, serão utilizadas redes de arrasto, peneiras e tarrafa com malha de 20 mm, ao longo de cada trecho avaliado. Espécies da ictiofauna endêmica, rara ou ameaçada serão soltas. Para as demais espécies, após a captura, os indivíduos serão anestesiados em óleo de cravo (Eugenol), identificados, pesados (g), mensurados (mm) e fotografados. Os peixes coletados serão acondicionados em sacos plásticos contendo etiqueta com indicações de sua classificação taxonômica, procedência, data e identificação do coletor, fixados em solução de formaldeído a 10%, permanecendo nesta solução por um período de 48 horas e depois transferidos para solução de etanol a 70%. A coleta ictiológica foi permitida pela autorização para captura, coleta e transporte de material biológico número nº 55430-1, expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade – ICMBio, Ministério do Meio Ambiente – MMA. O material testemunho será depositado na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia Joao Moojen da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Estrutura de habitat

Em cada seção, será medida a profundidade do canal com auxílio de uma haste graduada e avaliado visualmente o volume de madeira grande e presença de sedimento fino. Avaliaremos ainda o sedimento fino em dez pontos equidistantes dentro de cada seção. A caracterização do canal principal e suas variações morfológicas (número de barras de canal, pedaços grandes de madeira, leito sazonal, remansos, canais laterais) e o tipo de fluxo (piscina, suave, rápido ou queda) serão determinados visualmente. A declividade da seção será medida com uma mangueira de nível graduada de 20 metros de comprimento. A sinuosidade do canal será determinada a partir de marcações de uma bússola ao longo do trecho amostral.

A caracterização do habitat em cada transecto abrangerá a calha e a zona ripária do curso d'água. A profundidade será medida com o auxílio de uma haste graduada. O tipo de substrato (rocha lisa, rocha rugosa, concreto/asfalto, matacão largo, matacão, bloco, cascalho grosso, cascalho fino, areia, silte/argila/lama, madeira, outro) será visualmente determinado em cinco pontos equidistantes em cada transecto transversal. A imersão do substrato será visualmente estimada e todo substrato mais fino que areia será considerado 100% imerso. A quantificação e determinação da complexidade do habitat e de abrigos para peixes (algas filamentosas, plantas aquáticas, pedaços de madeira, árvores vivas/raízes, vegetação pendurada a menos de 1 metro da lamina d'água, margem escavada, matacão e estruturas artificiais) serão feitas visualmente com base na área da calha que se estende 5 metros a jusante e 5 metros a montante do transecto transversal. O ângulo das margens será determinado utilizando um clinômetro. A largura escavada da margem, a largura molhada da calha, a largura das barras de canal, a largura e a altura do leito sazonal e a altura da incisão da calha serão medidas com uma trena.

A cobertura do dossel sobre a calha será determinada utilizando um densiômetro convexo (Lemmon, 1957), no centro do canal (montante, jusante, direita e esquerda) e em suas margens (direita e esquerda). Estimativas para zona ripária serão feitas com base numa área de 10 m² distribuídos equitativamente a jusante e a montante do transecto transversal, em cada uma das margens. Nessa área, o percentual de cobertura de cada tipo de vegetação (árvores grandes, árvores pequenas, arbustos lenhosos/mudas, ervas sem tronco lenhoso/gramíneas) ou de solo exposto/coberto por serrapilheira serão visualmente estimados para o dossel, sub-bosque e vegetação rasteira.

A partir do protocolo de habitat físico, serão calculadas 257 métricas (Kaufmann et al., 1999; Peck, 2008). Essas métricas correspondem a 11 características principais do habitat físico: vazão e velocidade da água (4), morfologia do canal (28), substrato (37), tipo de fluxo (17), declividade (4), sinuosidade (1), cobertura vegetal riparia medida por densiômetro (4), cobertura vegetal riparia determinada visualmente (33), madeira no corpo d'água (64), abrigo para peixes (36) e impacto humano (29). Dessas, serão selecionadas aquelas que não apresentaram

predominância de valores iguais a zero e que tiverem pouca variação entre seus valores. Utilizaremos a similaridade na composição de espécies (Índice de Bray-Curtis) ponderada pela abundância nos trechos amostrais como variável resposta e as variáveis de habitat físico e de qualidade da água como as variáveis explicativas, procurando entender quais variáveis de habitat, hoje, determinam as comunidades de peixes. Usaremos modelos lineares baseados em distância (DISTLM) para testar quanto da variabilidade das comunidades de peixes pode ser explicada pelas condições físicas do habitat. Indicaremos então quais variáveis, a cada ano de coleta ou para cada grupo de pontos (preservados e impactados) mais atuam sobre as comunidades, permitindo a identificação dos alvos prioritários de intervenção. Utilizaremos o software Primer + Permanova (Clarke & Gorley 2006).(Figura 1)

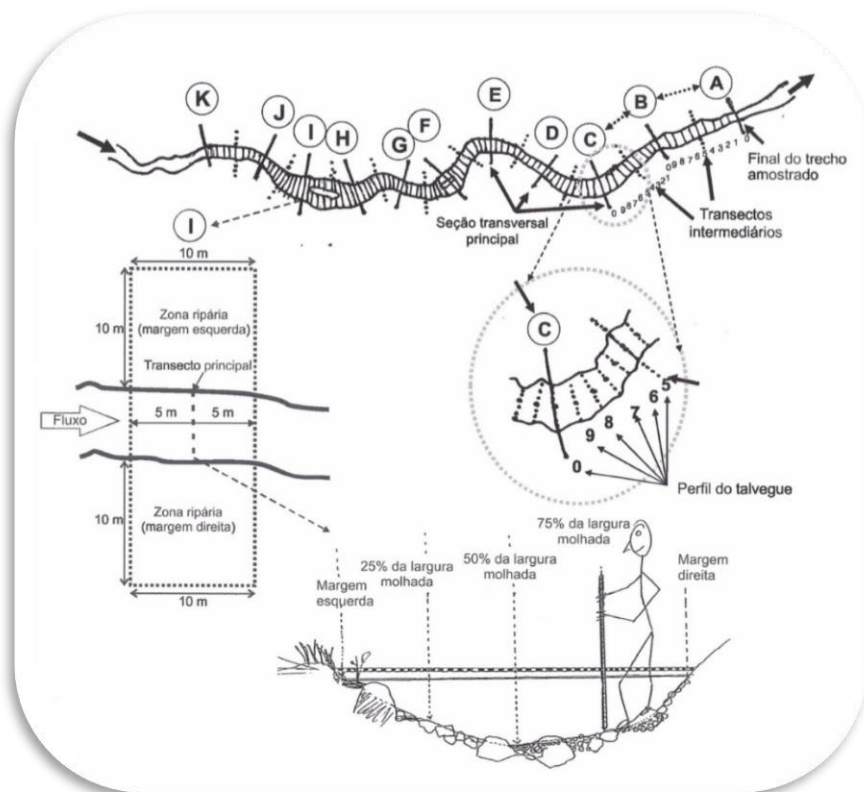


Figura 1: Ilustração da metodológica de coleta de dados de estrutura de habitat para o índice de integridade biótica (IIB).

Avaliação da Integridade Biótica

Inicialmente, a partir dos dados do protocolo de habitat físico, os pontos de coleta serão separados em três grupos: degradados, intermediários e menos impactados. Avaliaremos um total de 94 métricas de peixes para possível inclusão no IIB. As métricas estarão relacionadas à: riqueza e composição; dominância; traços biológicos e tolerância. As métricas de riqueza e composição incluirão riqueza total e abundância de indivíduos, riqueza de família / ordem e porcentagem de indivíduos em cada família / ordem. As métricas de diversidade e dominância incluirão porcentagens de espécies dominantes, espacial (únicos + duplicatas) e raridade numérica (únicos + duplicatas), riqueza e abundância de espécies comuns (espécies coletadas em mais de 50% dos sítios), indivíduos e densidade de indivíduos nativos. As características

biológicas incluirão guildas tróficas, de habitat e de história de vida. A métrica de tolerância avaliada exclusivamente para a ictiofauna será baseada na porcentagem de indivíduos de *Poecilia reticulata*, uma espécie exótica indicativa de maior qualidade da água e conhecida por aumentar seu tamanho populacional em ambientes perturbados antropologicamente. A triagem métrica consistirá de três etapas: escala métrica, responsividade e redundância / poder explicativo. Métricas com intervalo insuficiente (métricas de riqueza com intervalo <5, métricas de porcentagem com intervalo <10% e métricas com valores de 95% zero) serão excluídas. A capacidade de cada métrica para discriminar os locais menos e mais perturbados será testada através de ANOVA quando as premissas de normalidade foram cumpridas. Caso contrário, utilizar-se-á o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Métricas que não diferirem ($p > 0,05$) entre os locais menos e mais perturbados serão excluídas. Finalmente, entre métricas correlacionadas ($> 0,70$), serão excluídas aquelas que apresentarem pouca capacidade de agregar informação em uma Análise de Componentes Principais (PCA). Após a seleção de métricas, usaremos abordagens diferentes para construir dois índices para a ictiofauna. O primeiro será desenvolvido sem qualquer tratamento e os valores considerados serão os obtidos no campo. Como algumas métricas variam com as características da paisagem natural (elevação, tamanho do córrego, declive, etc.), no segundo, regrediremos as métricas biológicas selecionadas contra a elevação, a inclinação e a área de captação. Os valores com resultados significativos ($p < 0,05$) serão corrigidos subtraindo os valores preditos dos observados para obter os valores métricos residuais. Para construir os dois índices, padronizaremos todas as métricas selecionadas em uma escala comum e as combinaremos em um índice final. Métricas positivas, com aumentos indicando maior condição biótica, terão seus valores divididos pelo seu 95o percentil e multiplicados por 100. Valores acima de 100 serão considerados super ótimos e considerados como 100. Para métricas negativas, com diminuições indicando maior condição biótica, subtrairemos o valor métrico de 100 e dividiremos o resultado por 100 menos o percentil 5, também multiplicado por 100, tornando-se assim uma métrica positiva. Utilizar-se-á pontuação continua (0-10) para pontuação das métricas selecionadas.

SUBPROJETO II

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRESENÇA DE POLUENTES SOBRE A ECOLOGIA TRÓFICA DA ICTIOFAUNA DA BACIA DO RIO DOCE

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Abdala Dergam dos Santos	Coordenador do Projeto	UFV

Paulo dos Santos Pompeu	Desenvolvimento do projeto	UFLA
Carlos Frankl Sperber	Auxílio no desempenho experimental	UFV
Frederico Fernandes Ferreira	Coordenação das equipes de campo	UFV

2. ESCOPO

O estudo da estrutura trófica de comunidades biológicas nos fornece uma descrição da organização e funcionamento do ecossistema e das interações entre as comunidades. Comparar a estrutura trófica das comunidades ao longo de gradientes ambientais pode fornecer interpretações em relação a sua organização trófica e serve de base para avaliar impactos antrópicos presentes e futuros. Esta proposta tem como objetivo avaliar a influência da lama de rejeitos provenientes do rompimento da barragem “Fundão” na complexidade da estrutura trófica das comunidades de peixes da bacia do rio Doce. Para tanto, serão avaliados, em 10 cursos d’água, a estrutura e o nicho isotópico das comunidades de peixes, calculando-se métricas descritivas para toda a comunidade, baseadas em isótopos estáveis de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$. Também deverão ser analisados os conteúdos estomacais da ictiofauna. Além dos peixes, seus potenciais itens alimentares e produtores primários da área de estudo, serão coletados. Desta forma, será possível descrever se houve mudanças na estrutura trófica da área estudada, após o impacto.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Avaliar a influência do rejeito de minério de ferro provenientes do rompimento da barragem “Fundão” na estrutura trófica das comunidades de peixes da bacia do rio Doce, bem como determinar o fluxo de energia/carbono e investigar a absorção e assimilação do N_{15} enriquecido com o efluente de esgoto através de toda a teia trófica.

Objetivos Específicos

1. Avaliar como a presença do rejeito altera o uso do carbono pelas comunidades de peixes da bacia do rio Doce.
2. Quantificar os fatores que suportam as comunidades de peixes ao longo desse gradiente de contaminação, avaliando futuramente, se possível, em escala temporal.
3. Avaliar como a presença do rejeito atua na estrutura trófica das comunidades de peixes de cursos d’água de médio porte da bacia do Rio Doce, em escala temporal (se houver renovação do projeto).
4. Comparar a comunidade de peixes dos pontos mais afetados pelo rejeito na calha do rio Doce com a comunidade de peixes de afluentes que apresentam vazão similar e diferentes condições de preservação.
5. Testar se a variação na estrutura trófica da comunidade ocorre devido à substituição de espécies ou em resposta às alterações nos hábitos alimentares dos peixes.

6. Investigar a absorção e assimilação do N₁₅ enriquecido com o efluente de esgoto através de toda a teia trófica,
7. Avaliar se através do enriquecimento do isótopo de nitrogênio nos recursos, e possível fazer predições sobre a dispersão e níveis de poluentes ao longo da bacia do rio Doce.
8. Correlacionar a assinatura de nitrogênio de recursos e consumidores com variáveis que interferem nas condições de preservação da bacia, tais como: PIB agrícola, presença industrial, mineradoras, presença de rochas carbonáticas, número de municípios e habitantes, qualidade de água, entre outros.
9. Avaliar se, através do enriquecimento do isótopo de nitrogênio no tecido dos peixes, e possível fazer predições sobre a residência e circulação dos peixes da bacia do rio Doce.
10. Avaliar como os isótopos estáveis podem auxiliar no fornecimento de informações sobre a biologia das espécies migradoras de peixes (p.e.: área de vida).

4. PRODUTOS

#	Produto	Descrição	Data de Entrega	Responsável
1	RELATÓRIO DO SUBPROJETO II	SUBPROJETO II: Entrega de relatório com análise das primeiras amostras de isótopo estável coletadas dos 40 pontos.	1º - 30/08/2020 2º - 15/03/2021	Paulo dos Santos Pompeu
2	RELATÓRIO COMPILADO FINAL	Relatório compilado incluindo e discutindo os principais pontos abordados e resultados encontrados no projeto.	15 de Março 2021	Jorge Abdala Dergam dos Santos

5. METODOLOGIA

Organismos

As análises de isótopos estáveis terão os peixes como organismos principais, mas incluirão também todas as suas potenciais fontes de recursos, como insetos aquáticos, vegetação ciliar, algas filamentosas, perifíton, etc.

Desenho amostral

Ao longo da bacia do rio Doce, selecionamos 40 pontos amostrais que incluirão, além da calha principal do rio, alguns de seus principais afluentes: rios Piranga, do Carmo, Matipó, Suaçuí Grande, Caratinga, Santo Antônio, Manhauçu, Piracicaba e Baixo Guandu (ver ANEXO I: Apresentação dos pontos de amostragem propostos para essa proposta). A amostragem será realizada por duas equipes cada uma composta de quatro pessoas sendo pelo menos 2 biólogos, um auxiliar de campo e um pescador da região. Cada uma das duas equipes irá coletar 20 dos 40 pontos na estação seca e 20 na estação chuvosa durante 16 meses (extensíveis para 4 anos),

totalizando os 40 pontos amostrados pelas duas equipes em ambas estações. Desses 40 pontos, 15 serão em áreas afetadas pelo rejeito e 25 serão em áreas não afetadas (pontos de referência). Realizaremos amostragens de peixes e caracterização do habitat físico na estação seca (meses de abril a setembro) e a reamostragem de peixes na estação chuvosa (outubro a março), totalizando 2 (duas) amostragens durante a vigência desta proposta. Em cada ponto, definiremos um trecho de amostragem de 1km e acordo com o protocolo proposto por Peck et al. (2006) e modificado para rios tropicais por Callisto et al. (2014). Cada trecho será subdividido em 11 seções transversais (denominadas A a K, a jusante / montante), resultando em 10 seções de 100 metros (ANEXO II: Esquema dos transectos amostrados em cada trecho de curso d'água estudado, para a mensuração das variáveis ambientais e de habitat que compõem o Índice de Integridade Biótica). A amostragem de peixes será realizada com redes de emalhar de diferentes tamanhos (15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 e 80 mm entre nós adjacentes). Em cada estação amostral serão armados dois conjuntos de redes, duas redes de cada tamanho de malha. As redes serão armadas a tarde e serão revisadas durante a noite, para impedir a morte de espécimes emalhados, sendo retiradas no início da manhã, permanecendo na coluna d'água por aproximadamente 12 horas. Além das redes de espera, serão utilizadas redes de arrasto, peneiras e tarrafa com malha de 20 mm, ao longo de cada trecho avaliado.

Espécies da ictiofauna endêmica, rara ou ameaçada serão soltas. Para as demais espécies, após a captura, os indivíduos serão anestesiados em óleo de cravo (Eugenol), identificados, pesados (g), mensurados (mm) e fotografados. Será padronizada a coleta de até cinco amostras por espécie de peixe, por ponto de coleta. As amostras de isótopos serão mantidas congeladas até o processamento em laboratório, onde serão liofilizadas por 24 horas e moídas a pó fino e homogêneo utilizando almofariz e pilão. Também será padronizada a coleta de cinco amostras (em cada ponto amostral) de cada um dos seguintes recursos: (a) perifíton; (b) algas filamentosas; (c) matéria em suspensão; (d) sedimento (FPOM); (e) vegetação (gramíneas, bambu, cana, mata ciliar); (f) serrapilheira; (g) CPOM (matéria orgânica particulada grossa) e (h) macrófitas. Todo o processo de armazenamento e processamento das amostras de recursos ocorrerá de acordo com metodologia específica (De Carvalho et al., 2015). Após o término da preparação do material, as amostras armazenadas em tubos do tipo *ependorf* serão encaminhadas ao laboratório especializado em análise isotópica. Será também realizada a separação do conteúdo estomacal de 20 exemplares de cada espécie de peixe (sempre que possível). Os itens alimentares serão identificados até a menor categoria taxonômica possível, seguindo manuais de identificação. Posteriormente, os peixes coletados serão acondicionados em sacos plásticos contendo etiqueta com indicações de sua classificação taxonômica, procedência, data e identificação do coletor, fixados em solução de formaldeído a 10%, permanecendo nesta solução por um período de 48 horas e depois transferidos para solução de etanol a 70%. A coleta ictiológica foi permitida pela autorização para captura, coleta e transporte de material biológico número nº 55430-1, expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Ministério do Meio Ambiente – MMA. O material testemunho será depositado na Coleção

Análises isotópicas

Para determinar as contribuições relativas de cada fonte de carbono na alimentação dos peixes será utilizado o pacote computacional de análise de isótopos estáveis do R - SIAR (Parnel et al, 2010) além de se utilizar a análise de conteúdo estomacal (metodologia proposta por Kawakami & Vazzoler, 1980) para complementar os resultados encontrados na análise isotópica. Os valores de fracionamento considerados serão de 1‰ para carbono e de 3‰ para nitrogênio (De Carvalho et al., 2017a) Diferenças nas razões isotópicas dos recursos e consumidores e mudanças ao longo de 16 meses, avaliando se possível em escala temporal, entre locais afetados e não afetados, serão testadas através de one-way ANOVAs quando os pressupostos de normalidade forem atendidos. Para os dados que não tenham distribuição normal, será então utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando diferenças significativas ($p < 0,05$) forem observadas, as medias serão comparadas utilizando o procedimento Tukey post-hoc.

Para avaliar a estrutura das comunidades de peixes e como elas variam temporalmente e espacialmente na bacia, serão calculadas as métricas propostas por Layman et al. (2007), que refletem importantes aspectos da estrutura trófica e do nicho ocupado pela comunidade, são elas: 1) amplitude de Nitrogênio 15 (N_{15}) que indica a distância entre os valores mais e menos enriquecidos de N_{15} para os recursos e para os consumidores. Geralmente, uma maior faixa de N_{15} sugere a presença de mais níveis tróficos em uma comunidade; 2) amplitude de Carbono 13 (C_{13}) que representa a variedade de recursos utilizados pela comunidade; 3) distância média do centroide que fornece uma medida do grau médio de diversidade trófica dentro de uma teia trófica e calculada a partir da distância euclidiana de cada espécie para o centroide; 4) distancia media do vizinho mais próximo (NND) que representa uma medida da densidade total da comunidade. Teias tróficas com uma grande proporção de espécies com ecologias tróficas semelhantes (maior redundância trófica) terão uma NND menor do que as teias em que as espécies são, em média, mais divergentes em relação ao seu nicho trófico; 5) média das distancias euclidianas do vizinho mais próximo que fornece uma medida da uniformidade da densidade espacial que e menos influenciado que o NND pelo tamanho da amostra. Valores baixos de SDNND sugerem uma distribuição mais uniforme de nichos tróficos. Para o cálculo dessas métricas será utilizado o pacote *Stable Isotope Bayesian Ellipses in R* (SIBER) (Jackson et al., 2011). Os nichos isotópicos das comunidades de peixes também serão quantificados utilizando o pacote SIBER (SEA, SEAc e SEAb - expressas em ‰²). A área de elipse padrão (SEA) representa o espaço de nicho isotópico central e um proxy da riqueza e uniformidade dos recursos consumidos pela população (Bearhop et al., 2004). Uma pequena correção do tamanho da amostra (indicada pela letra "c") será aplicada a SEA para aumentar a precisão das comparações, permitindo a comparação de nichos de comunidades com diferentes tamanhos de amostra. As estimativas bayesianas de SEAb (bootstrap $n = 10000$ - indicado pela letra "b") serão geradas para testar diferenças significativas entre as larguras do nicho isotópico das comunidades de peixes, comparando seus intervalos de confiança (Jackson et al., 2011) As métricas SEA, SEAc e SEAb

serão calculadas individualmente para os pontos amostrais. Todas as métricas citadas acima serão comparadas entre os 40 pontos amostrais ao longo de 16 meses (extensíveis para 4 anos), avaliando em escala temporal. Para estimar a posição trófica dos peixes será utilizado o método proposto por Vander Zanden et al. 1997 adotando-se valores de fracionamento de 3‰ para nitrogênio (De Carvalho et al., 2015).

Diferenças nas razões isotópicas dos recursos e consumidores e nos níveis tróficos ocupados pelas espécies entre os pontos e se possível, ao longo dos anos, serão testadas através de one-way ANOVAs quando os pressupostos de normalidade forem atendidos. Para os dados que não tenham distribuição normal, será utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando diferenças significativas ($p < 0,05$) forem observadas, as médias serão comparadas utilizando o procedimento Tukey post-hoc. As relações entre as assinaturas de nitrogênio (dos peixes e recursos) e as variáveis que influenciam as condições ambientais da bacia serão testadas através de DistLM.

SUBPROJETO III

DINÂMICA POPULACIONAL E EVOLUTIVA DA ICTIOFAUNA NA BACIA DO RIO DOCE

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Abdala Dergam dos Santos	Coordenador do Projeto	UFV
Frederico Fernandes Ferreira	Coordenação das equipes de campo	UFV
Natália Maria de Freitas Vicente	Desenvolvimento do projeto	UFV
Pedro Marcus Pereira Vidigal	Desenvolvimento do projeto	UFV

2. ESCOPO

Ferramentas genéticas podem fornecer informações importantes e únicas sobre a história evolutiva, relações filogenéticas, padrões de migração e histórias demográficas de populações de espécies de peixes. Essas pesquisas ajudarão na construção de políticas e medidas de manejo para a manutenção de populações naturais. Nesse subprojeto, buscaremos: (i) produzir uma análise temporal da variabilidade e estruturação genética das populações de peixes da bacia do Rio Doce em locais afetados e não afetados pelo rompimento da barragem de “Fundão”; (ii) verificar a contribuição de cada um dos tributários amostrados, na recolonização da calha principal do rio Doce após o rompimento da barragem de “Fundão”; (iii) investigar a conectividade (fluxo gênico entre as populações de espécies de peixes) entre os tributários e a calha principal do rio Doce e (iv) produzir um estudo da história evolutiva recente da ictiofauna da bacia do rio Doce. O sucesso na recolonização da ictiofauna

do rio Doce depende de fatores complexos e dinâmicos, como os tamanhos populacionais dos peixes remanescentes e a conectividade das populações nos tributários da Bacia que não foram afetados. Estudos que objetivem o monitoramento desse processo são fundamentais para a adoção de medidas de proteção e manejo. Assim, propomos caracterizar as populações de peixes da bacia utilizando as ferramentas Rad-Seq (restriction-site associated DNA sequencing) e microssatélites. Os dados obtidos permitirão definir áreas prioritárias para a conservação de peixes na bacia e a adoção de medidas específicas, como a transposição de peixes, se for necessário.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Investigar o papel dos tributários no processo de recolonização da ictiofauna na calha principal do rio Doce após o rompimento da barragem de rejeitos “Fundão”.

Objetivos Específicos

- (i) Avaliar temporalmente da variabilidade e estruturação genética das populações de peixe dos tributários e da calha principal da bacia do rio Doce;
- (ii) Ampliar o conhecimento sobre a diversidade e a distribuição da ictiofauna da bacia do rio Doce;
- (iii) Produzir um ranqueamento da importância ecológica e conservacionista de cada tributário baseado na contribuição potencial ou real do seu aporte de peixes para a calha principal.
- (iv) investigar a conectividade (fluxo gênico entre as populações de espécies de peixes) entre os tributários e a calha principal do rio Doce e
- (iv) produzir um estudo da história evolutiva recente da ictiofauna da bacia do rio Doce.

4. PRODUTOS

#	Produto	Descrição	Data de Entrega	Responsável
1	RELATÓRIO DO SUBPROJETO III (A)	SUBPROJETO III: Entrega de relatório com análise de amostras analisadas de Rad-Seq.	1º - 30/08/2020 2º - 28/02/2021	Natália Maria de Freitas Vicente
2	RELATÓRIO DO SUBPROJETO III (B)	SUBPROJETO III: Entrega de relatório com análise de 500 amostras analisadas de microssatélite.	30 de Agosto 2020	Jorge Abdala Dergam dos Santos
3	RELATÓRIO COMPILADO FINAL	Relatório compilado incluído e discutindo os principais pontos abordados e resultados encontrados no projeto.	15 de Março 2021	Jorge Abdala Dergam dos Santos

5. METODOLOGIA

6.1 Procedimentos comuns a ambas as técnicas

Organismos

Esse subprojeto tem como foco a ictiofauna da calha principal do rio Doce, e alguns de seus principais afluentes: rios Piranga, do Carmo, Matipó, Suaçuí Grande, Caratinga, Santo Antônio, Manhuaçu, Piracicaba e Baixo Guandu. No total, foram estimadas 77 espécies de peixes para a bacia do rio Doce. Segundo o IBAMA (2015) a porção mineira da bacia (alto e médio Doce) possui 12 espécies endêmicas e outras 11 espécies estão ameaçadas de extinção.

Desenho amostral

Ao longo da bacia do rio Doce, selecionamos 40 pontos amostrais que incluirão, além da calha principal do rio, alguns de seus principais afluentes: rios Piranga, do Carmo, Matipó, Suaçuí Grande, Caratinga, Santo Antônio, Manhuaçu, Piracicaba e Baixo Guandu (ver ANEXO I: Apresentação dos pontos de amostragem propostos para essa proposta). A amostragem será realizada por duas equipes cada uma composta de quatro pessoas sendo pelo menos 2 biólogos, um auxiliar de campo e um pescador da região. Cada uma das duas equipes irá coletar 20 dos 40 pontos na estação seca e 20 na estação chuvosa durante 16 meses (extensíveis para 4 anos), totalizando os 40 pontos amostrados pelas duas equipes em ambas estações. Desses 40 pontos, 15 serão em áreas afetadas pelo rejeito e 25 serão em áreas não afetadas (pontos de referência). Realizaremos amostragens de peixes e caracterização do habitat físico na estação seca (meses de abril a setembro) e a reamostragem de peixes na estação chuvosa (outubro a março), totalizando 8 (oito) amostragens durante a vigência desta proposta. Em cada ponto, definiremos um trecho de amostragem de 1km e acordo com o protocolo proposto por Peck et al. (2006) e modificado para rios tropicais por Callisto et al. (2014). Cada trecho será subdividido em 11 secções transversais (denominadas A a K, a jusante / montante), resultando em 10 secções de 100 metros. Para a amostragem nas drenagens com maior volume de água, serão utilizadas redes de emalhar, de diferentes tamanhos de malhas (15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 e 80 mm entre nós adjacentes), cada rede tem 10 metros de comprimento. Em cada estação amostral, serão armados dois conjuntos de redes, duas redes de cada tamanho de malha, no final da tarde. As redes serão armadas a tarde e serão retiradas no início da manhã, permanecendo na coluna d'água por aproximadamente 12 horas. Além das redes de espera, serão utilizadas redes de arrasto, peneiras e tarrafa com malha de 20 mm. As coletas qualitativas serão realizadas sem esforço padronizado, possibilitando explorar todos os tipos de ambientes disponíveis (corredeiras, poços, locas etc.) na área estudada. As peneiras serão posicionadas perpendicularmente ao substrato com a boca voltada para a montante, sendo o substrato à sua frente revolido com os pés e mãos, com o objetivo de desalojar os peixes, os quais serão carregados pela corrente para dentro da peneira. A rede de arrasto será utilizada por duas pessoas, cada qual em uma extremidade, posicionando-a paralelamente a margem e

percorrendo-se todo o espaço a sua frente de tal forma que todos os peixes que se abrigavam na vegetação marginal ao alcance da rede sejam capturados. Os trechos serão percorridos de jusante a montante (contra o fluxo da água) para evitar o levantamento de suspensão que poderia afugentar os peixes.

Processamento do material em campo

Após a captura, os animais serão identificados, pesados (g), mensurados (mm) e fotografados. Espécies endêmicas, raras ou ameaçadas serão amostradas, fotografadas e soltas. Os demais exemplares coletados serão anestesiados em Eugenol R diluído na água, antes da eutanásia. Posteriormente será retirada amostras de tecido para estudos moleculares, sendo conservados em tubos Eppendorf contendo álcool absoluto. Os exemplares cujas amostras foram retiradas serão acondicionados em sacos plásticos contendo etiqueta com indicações de sua classificação taxonômica, procedência, data e identificação do coletor. Posteriormente, serão fixados em solução de formaldeído a 10%, permanecendo nesta solução por um período de 48 horas e então, serão transferidos para solução de etanol a 70%. O material testemunho será depositado na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia Joao Moojen da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A coleta ictiológica foi permitida pela autorização para captura, coleta e transporte de material biológico número 55430-1, expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Ministério do Meio Ambiente – MMA.

Extração e quantificação do DNA

Visando a obtenção de material de alta pureza e em grande quantidade, extrairemos o DNA das amostras coletadas utilizando o Kit Qiagen DNeasy 96 Blood and Tissue extraction. As quantidades de DNA gnômico, proteínas e impurezas serão obtidas por espectrofotometria com as absorvâncias a 260, 280 e 230 nm respectivamente, no equipamento Nanodrop™.

6.2 Procedimentos para RAD-seq

Construção da biblioteca e sequenciamento para RadSeq

O DNA gnômico total extraído será enviado para Floragenex (<https://www.floragenex.com/radseq/>) para a construção da biblioteca (utilizando a enzima de restrição *SbfI*) e sequenciamento no sistema Illumina HiSeq 4000.

Análise dos dados do sequenciamento e identificação dos SNPs

Utilizaremos duas estratégias para a análise bioinformática, o mapeamento em um genoma de referência e a montagem de novo. No mapeamento, será selecionado o genoma da espécie *Astyanax mexicanus*. As reads serão alinhadas e os polimorfismos serão analisados nos diferentes indivíduos. Na montagem de novo, as reads serão agrupadas em contigs visando

gerar um genoma de referência para as espécies alvo. Identificaremos os SNPs usando os protocolos propostos por Rochette & Catchen (2017) com o software STACKS e o guia "Best Practices for SNP calling" proposto pelo Broad Institute (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>) com o software GATK versão 4.0. Os SNPs identificados por cada abordagem serão comparados e somente serão considerados aqueles que forem identificados por ambas.

6.3 Procedimentos para microssatélites

Amplificação e labeling dos microssatélites

Para cada indivíduo e para cada par de primers será feita amplificação via PCR usando protocolos padrão. Será feito um pool de todos os PCRs feitos para cada indivíduo, e aos mesmos serão adicionados adaptadores para sequenciamento no IonTorrent PGM. Os adaptadores tem barcodes específicos, e assim tem como identificar cada indivíduo por uma combinação única de barcodes.

Preparo e sequenciamento da biblioteca genômica

Será feito um pool com os indivíduos coletados (todos os microssatélites ou todos os genes), cada um deles individualizado via uma combinação única de barcodes. Esse pool equimolar será submetido à amplificação clonal. A biblioteca será posteriormente purificada, e carregada no Chip 318. O Chip 318 será aplicado no IonTorrent PGM onde procederá o sequenciamento NGS.

Estimativa da diversidade genética

As estimativas de diversidade genética serão determinadas analisando as 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 análise os softwares ARLEQUIN (Excoffier et al., 2010), DNASP 5.4 (Rozas et al., 2003) e BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1996).

Estimativa das frequências alélicas

As frequências alélicas e o número de alelos efetivos e privados serão obtidos através do software PopGene v3.3 (Raymond & Rousset, 1995). O mesmo software deverá 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).

SUBPROJETO IV

COMPOSIÇÃO DAS ASSEMBLEIAS E VARIAÇÕES DA DIETA DE PEIXES DA BACIA DO RIO DOCE

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Abdala Dergam dos Santos	Coordenador do Projeto	UFV
Priscilla Caroline Silva	Projeto de hábitos alimentares	UFV
Karine Bonato	Projeto de hábitos alimentares	UFV

2. ESCOPO

Dados preliminares obtidos recentemente indicam que, na porção capixaba da bacia do rio Doce, existe um desequilíbrio nas guildas tróficas. Dada a sua restrição espacial, é difícil compor hipóteses e concluir resultados sem as informações de vastos setores à montante da bacia. Desconhecemos a composição de espécies de peixes da porção mineira, e se existe algum fluxo gênico entre as populações do alto, médio e baixo rio Doce e se nestas porções as espécies consomem itens alimentares que variam, por exemplo, na presença de espécies exóticas. Para atingirmos o objetivo de ampliar o conhecimento de uma forma geral à bacia do rio Doce, são essenciais os estudos da composição da comunidade de peixes baseado em taxonomia alfa e DNA barcode para espécies de difícil identificação, aliados a estudos ecológicos como o de biologia alimentar. Os dados prévios de apenas seis campanhas realizadas na porção capixaba já apontam a existência de espécies nunca antes registradas para a bacia, sendo que algumas delas podem representar espécies novas. A partir da delimitação das espécies, os estudos ecológicos são realizados com melhor embasamento e possibilitam o delineamento de hipóteses sobre as dinâmicas das comunidades frente aos distúrbios ocorridos no ambiente. Quando associados a estudos demográficos, as espécies de peixes com hábitos específicos podem demonstrar expansão ou declínio, conforme os recursos que existem em ambientes simplificados por impactos agudos e crônicos, em contraste com ambientes menos alterados, considerados como de referência.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Os objetivos são responder as seguintes perguntas:

1. A presença do rejeito alterou os hábitos alimentares das principais espécies?
2. As dietas das espécies nativas são alteradas na presença de espécies exóticas? Esta característica se altera em ambientes impactados ou não impactados pelo rejeito?
3. As porções alta, média e baixa do rio Doce apresentam assembleias diferentes de espécies, em termos de composição, biomassa e de guildas tróficas? Quais são as diferenças e semelhanças com as comunidades os afluentes próximos?

Objetivos específicos

1. Utilizar a análise estomacal como ferramenta para o entendimento da situação da bacia do rio Doce, sendo analisadas as espécies mais abundantes e comuns aos pontos amostrados na parte capixaba da bacia.
2. Utilizar as informações de análises moleculares com o uso do COI para confirmar a identificação de espécies de difícil taxonomia (como exemplo as espécies dos gêneros *Astyanax*, *Geophagus* e *Hypostomus*);

4. PRODUTOS

#	Produto	Descrição	Data de Entrega	Responsável
1	RELATÓRIO DO SUBPROJETO IV	SUBPROJETO IV: Entrega de relatório com análise comparada da mudança na dieta alimentar de peixes coletados em pontos afetados e não afetados.	30 de Agosto 2020	Priscilla Caroline Silva e Karine Bonato
2	RELATÓRIO COMPILADO FINAL	Relatório compilado incluído e discutindo os principais pontos abordados e resultados encontrados no projeto.	15 de Março 2021	Jorge Abdala Dergam dos Santos

5. METODOLOGIA

Processamento do material em campo

Serão análise do conteúdo estomacal nos mesmos animais coletados pontos das demais propostas. Após a captura, os animais serão identificados, pesados (g), mensurados (mm) e fotografados. Espécies endêmicas, raras ou ameaçadas serão soltas. Os demais exemplares coletados serão anestesiados em Eugenol R diluído na água, antes da eutanásia. Posteriormente serão retiradas amostras de tecido para estudos moleculares, sendo conservados em tubos Eppendorf contendo álcool absoluto. Os exemplares cujas amostras de estômago foram retiradas serão acondicionados em sacos plásticos contendo etiqueta com indicações de sua classificação taxonômica, procedência, data e identificação do coletor. Posteriormente, serão fixados em solução de formaldeído a 10%, permanecendo nesta solução por um período de 48 horas e então, serão transferidos para solução de etanol a 70%. No Laboratório de sistemática Beagle (UFV), será feita a análise do conteúdo estomacal dos animais fixados. E posteriormente depositado na Coleção Ictiológica do Museu de Zoologia Joao Moojen da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A coleta ictiológica foi permitida pela autorização para captura, coleta e transporte de material biológico número 55430-1, expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Ministério do Meio Ambiente – MMA.

SUBPROJETO V

ESTUDO DA ICTIOFAUNA DA BACIA DO RIO DOCE APÓS O ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITO DA SAMARCO, COM FOCO EM SEGURANÇA ALIMENTAR: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Abdala Dergam dos Santos	Coordenador do Projeto	UFV
Mariella Bontempo Duca de Freitas	Desenvolvimento do projeto	UFV

2. ESCOPO

O rompimento da barragem de Fundão, próximo a Mariana – MG, e o consequente derramamento de minério nos cursos d'água que drenam a barragem, resultaram num impasse em relação ao consumo de peixes, por parte da população local. A determinação da presença de metais em tecido muscular de peixes é de fundamental relevância para a segurança alimentar das pessoas que vivem nesta região. A presença de metais pesados na água tem sido apontada como desencadeadores de estresse oxidativo em peixes, de forma que as análises tem sido utilizadas como marcadores de toxicidade de xenobióticos, pois conseguem demonstrar alterações teciduais decorrentes de possíveis contaminantes em diversos táxons. Além de proporcionar uma análise de saúde dos animais, as análises do estresse oxidativo tecidual também permitem formar um panorama geral das condições nas quais as espécies de peixes estão se reestruturando após o derramamento dos rejeitos da barragem, evidenciando quais espécies foram mais ou menos afetadas pelo incidente e quais locais apresentam mais ou menos alterações importantes. Com este estudo, espera-se descrever o status das enzimas antioxidantes nas espécies de peixes coletadas na bacia do rio Doce, analisando as possíveis diferenças entre os locais coletados e os tecidos mais afetados. Esperamos contribuir de maneira importante para as pesquisas na região do incidente, avaliando se estes animais foram prejudicados, se já se recuperaram e o grau ou intensidade de dano tecidual na capacidade antioxidante dos principais tecidos envolvidos na detoxicação. A integridade da capacidade antioxidante das células é um importante indicador da saúde animal, característica fundamental para dar suporte ao consumo humano.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é fornecer um detalhamento sobre os marcadores de estresse oxidativo em fígado e brânquias de diversas espécies de peixes coletadas em locais afetados pelo rompimento da barragem de dejetos de Mariana – MG, a fim de se avaliar se os animais que estão ocorrendo no ambiente modificado apresentam alterações teciduais condizentes com

a exposição a agentes estressores ou não, e ainda quais os tecidos, as espécies, e os locais possivelmente mais afetados, se houver.

4. PRODUTOS

#	Produto	Descrição	Data de Entrega	Responsável
1	RELATÓRIO DO SUBPROJETO V	SUBPROJETO V: Entrega de relatório com análise comparada do estresse oxidativo tecidual. de peixes coletados em pontos afetados e não afetados.	30 de Agosto 2020	Mariella Bontempo Duca de Freitas
2	RELATÓRIO COMPILADO FINAL	Relatório compilado incluído e discutindo os principais pontos abordados e resultados encontrados no projeto.	15 de Março 2021	Jorge Abdala Dergam dos Santos

5. METODOLOGIA

As espécies de peixe serão coletadas conforme desenho amostral especificado no subprojeto I. Amostras de fígado e brânquias serão removidas (aproximadamente 200 mg) para as dosagens do estresse oxidativo, perfazendo um total de aproximadamente 1000-1500 amostras de tecidos durante o período.

Avaliação do estresse oxidativo

Porções conhecidas de fígado e brânquias serão imediatamente removidas após eutanásia, pesadas e armazenadas em nitrogênio líquido, para posterior alocação em ultrafreezer (-80° C), até serem utilizadas para determinação dos marcadores de estresse oxidativo tecidual.

Determinação da defesa antioxidante

A atividade da SOD será mensurada no fígado e brânquias através de leitor de microplacas ($\lambda = 570\text{nm}$), de acordo com Dieterich et al. (2000), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Os resultados serão expressos U SOD mg proteína⁻¹. A atividade da CAT será mensurada segundo Aebi et al., (1984). A enzima será determinada pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM) em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e lido em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Será utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados serão expressos em U mg proteína⁻¹.

A atividade da enzima GST será mensurada de acordo com Habig et al. (1976), através

da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno. A atividade da enzima será estimada em uma mistura contendo CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 1 mM em etanol, glutationa redutase (GSH) 1 mM em fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e 10 μ L de sêmen, pelo aumento da absorbância ($\lambda = 340$ nm) por 60 s. O coeficiente de extinção molar do CDNB é $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ será utilizado para os cálculos e os resultados serão expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

A concentração de malondialdeído (MDA) será estimada conforme descrito por Wallin et al. (1993). Brevemente, 200 μ L serão homogeneizados a 400 μ L de uma solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,25 M), aquecido por 40 minutos em água fervente (90°C) e resfriado. Após resfriar, será acrescentado álcool butílico, agitado em vortex por ~2 min. e em seguida centrifugado (10 min a 3000 rpm). A fase superior será utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 532\text{nm}$). A concentração de MDA será determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados serão expressos em $\mu\text{M mg proteína}^{-1}$.

Para análise das proteínas carboniladas, grupos carbonil nas proteínas serão mensurados segundo Levine et al. (1990). Serão utilizados os pellets resultantes dos homogenatos do sêmen preparados para as enzimas, conforme descrito acima. Serão adicionados aos pellets 0.5 mL de solução de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM em ácido clorídrico 2 M, misturados em vortex e mantidos em temperatura ambiente no escuro e misturando a cada 15 minutos durante meia hora. Em seguida, 0.5mL de TCA 10 % gelado será adicionado em cada tubo, agitado com vortex, centrifugada (5,000 g por 10 min. a 4 °C) e o sobrenadante descartado. O precipitado será lavado três vezes com 1 mL de acetato de etila e etanol (1:1), agitado em vortex, centrifugado e o sobrenadante descartado. Ao final, 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6 % será adicionado nos tubos, agitados em vortex para dissolver o pellet e centrifugados para precipitar resíduos. Os danos às proteínas serão determinados no sobrenadante final, baseado nos grupos carbonil da reação com DNPH e mensurado em espectrofotômetro ($\lambda = 370\text{nm}$). O total de proteínas carboniladas (CP) será calculado baseado no coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{370} = 22,000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expresso em $\text{nmol mg proteína}^{-1}$.

Para a determinação dos níveis de GSH, o fígado e as brônquias serão utilizados para medir os níveis de GSH-eq (GSH-eq= 2 GSH +GSSG) e glutationa reduzida (GSH), de acordo com Akerboom e Sies (1981). Para dosar a glutationa oxidada (GSSG), a reação de GSH será interrompida com 2-vinylpyridine (2-VP) 0.5 M em etanol. As amostras serão incubadas por 1 h (Griffith 1980). As concentrações de GSSG e GSH-e serão determinadas pela formação de trinitrobenzeno (TNB), a partir da variação da absorbância a 412 nm durante 90 s. Os resultados serão expressos em nmol de GSH-eq, GSH ou GSSG por g de tecido úmido.

A concentração de proteína total dos tecidos será mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como curva padrão.

6. BIBLIOGRAFIA

- AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 121-126.
- DIETERICH, Sabine et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.
- HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- LEVINE, Rodney L. et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 464-478.
- LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- WALLIN, Boel et al. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10-15, 1993.
- BEARHOP, S., C. E. ADAMS & WALDRON, S. 2004. Determining trophic niche width: a novel 491 approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology* 73, 1007–1012.
- Callisto, Marcos; POMPEU, P. S. ; ALVES, C. B. M. ; SANTOS, G. B. . Prospects for the index of biotic integrity approach with fish and benthos in Cerrado drainage basins. In: Callisto, M.; Hughes, R.M.; Lopes, J.M. & Castro, M.A.. (Org.). *Ecological conditions in hydropower basins*. 1ed. Belo Horizonte: Companhia Energética de Minas Gerais, 2014, v. 1, p. 209-214.
- CARVALHO DR, LEAL CG, JUNQUEIRA NT, CASTRO MA, FAGUNDES DC, ALVES CBM, Hughes RM, Pompeu PS (2017) A fish-based multimetric index for Brazilian savanna streams. *Ecological Indicators*. 77:386–396
- Carvalho MS, Moreira RM, Ribeiro KD, Almeida AM (2017) Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis* 1(3): 37-41.
- CLARKE, K.R. & GORLEY, R.N. *Primer v.6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth, UK, 2006.
- Hellawell, J. M. *Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management*. London: Elsevier Applied Science, 1986. xiii+ 546 p.
- JACKSON, A. L.; INGER, R.; PARNELL, A. C.; BEARHOP, S. 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *J Anim Ecol*. 80: 595–602.
- KAUFMANN, P. R.; LEVINE, E. G.; ROBISON, C. S.; PECK, D. V. (1999). *Quantifying Physical Habitat in Wadeable Streams*, EPA/620/R-99/003. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Disponível em <http://www.epa.gov/emap/html/pubs/docs/groupdocs/surfwatr/field/phyhab.html>

- KAWAKAMI, E. & VAZZOLER, G. 1980. Método gráfico e estimativa de Índice Alimentar aplicado no estudo de alimentação de peixes. Boletim Institute of Oceanography, 29(2): 205-207.
- LAYMAN, C. A.; ARRINGTON, D.A.; MONTAÑA, C. G.; POST, D. M. 2007. Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? Ecology. 88: 42–48.
- LEMMON, P. E. 1957. A new instrument for measuring forest overstory density. Journal of Forestry 55(9):667-668.
- Merrit, R. W.; Cummins, K. W. 1993. An Introduction to the Aquatic Insects of North America. Ames, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 1996. 862 p.
- Parnell, A. C.; Inger, R.; Bearhop, S.; Jackson, A. L. 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. Plos One, v. 5, n. 3.
- Peck, D. V., Herlihy, A. T., Hill, B. H., Hughes, R. M., Kaufmann, P. R., Klemm, D.J., Lazorchak, J. M., McCormick, F. H., Peterson, S. A., Ringold, P. L., Magee, T. & Cappaert, M. R.. 2005. Environmental Monitoring and Assessment Program – Surface Waters Western Pilot Study: Field Operations Manual for Wadeable Streams. EPA Report EPA 600/R-05/xxx, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington, DC.
- PECK RC, GEBERS MA, VOAS RB, ROMANO E. The relationship between blood alcohol concentration (BAC), age, and crash risk. J Safety Res. 2008;39(3):311-9.
- Rochette NC & Catchen, JM (2017) Deriving genotypes from RAD-seq short-read data using Stacks. Nature Protocols, 12, 2640–2659pp.
- Vander Zanden, M. J.; Cabana, G.; Rasmussen, J. B. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. 1997. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54(5), p. 1142–1158.

Anexo 1

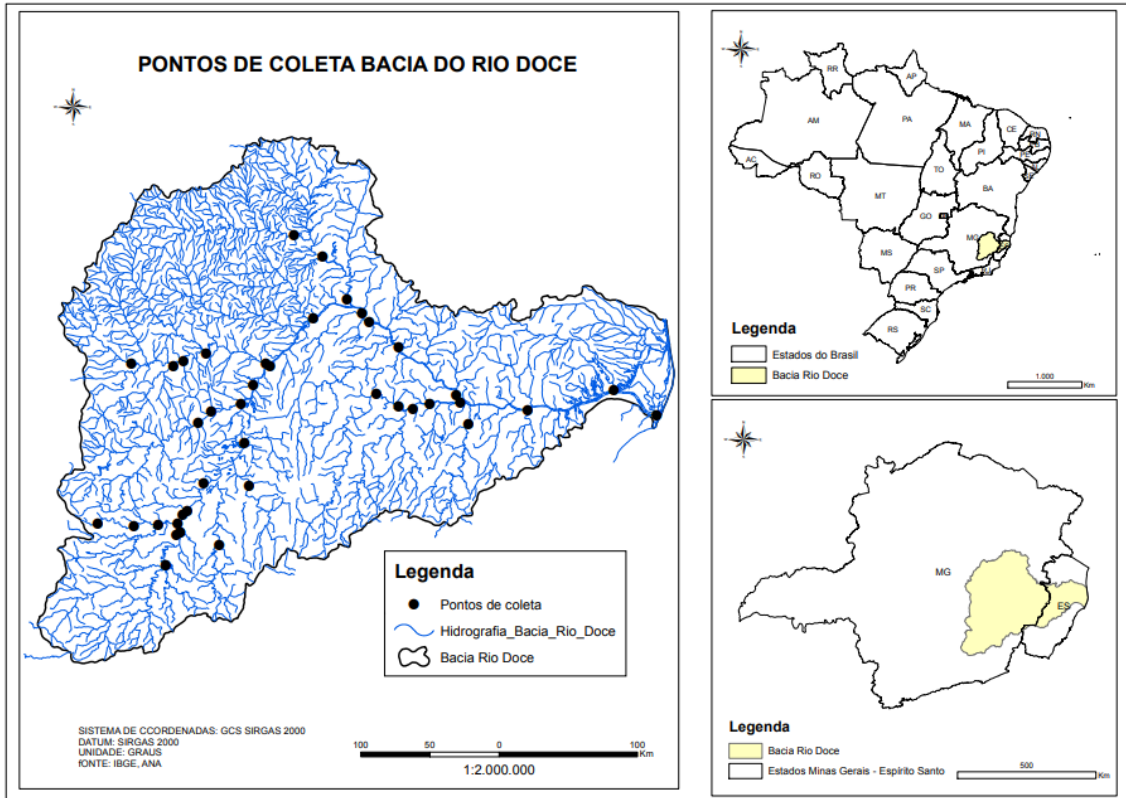


Figura 2: Mapa indicando os pontos de coleta.

PONTO AMOSTRAL	NOME DA DRENAGEM	LOCALIZAÇÃO	ZONA UTM COORDENADAS	PONTO AMOSTRAL	NOME DA DRENAGEM	LOCALIZAÇÃO	ZONA UTM COORDENADAS
Ponto 1	Rio Gualaxo do Norte	Mariana, MG	23K 0663787 7757153	Ponto 9	rio Doce	Naque, MG	23K 0782354 7869156
Ponto 2	rio Doce	Pingo D'agua, Parque Estadual do rio Doce, MG	23K 0764251 7814314	Ponto 10	rio Doce	Rio Doce, UHE risoleta neves, MG	23K 721890 7764082
Ponto 3	rio Gualaxo do Norte	Paracatu de baixo, subdistrito de Monsenhor Horta, Mariana, MG	23K 0688284 7754717	Ponto 11	rio Santo Antônio	Santo antonio do rio abaixo, MG	23K 0687610 7872625
Ponto 4	rio do Carmo	Barra Longa, MG	23K 0704609 7756231	Ponto 12	rio Santo Antônio	Ferros, MG	23K 0716429 7870370
Ponto 5	rio Piranga	Guaraciaba, MG	23K 0709518 7726784	Ponto 13	rio Doce	São José do Goiabal, MG	23K 0735965 7785306
Ponto 6	rio Piranga	Rio Doce, MG	23K 0719392 7750689	Ponto 14	rio Santo Antônio	Santo Antônio da Fortaleza, MG	23K 0738866 7879318
Ponto 7	rio Doce	Rio Doce, MG	23K 0717886 7756690	Ponto 15	rio Carmo	Rio Doce, MG	23K 0716721 7756192
Ponto 8	rio Doce	Rio Doce, MG	23K 0724451 7765328	Ponto 16	rio Piranga	UHE Brito, MG	23K 0710222 7737948

Ponto 19	rio Casca	São José do Goiabal, MG	23K 0746357 7781360	Ponto 30	rio Suaçuí Grande	Matias Lobato, MG	24K 0188844 7943845
Ponto 20	Rio Corrente	Periquito, MG	23k 796806 7896309	Ponto 31	rio Doce	Aimorés, MG	24k 279689 7849766
Ponto 21	rio Doce	Tumiritinga, Mg	24k 220565 7900663	Ponto 32	rio Doce	Baixo Guandu, ES	24k 288311 7841895
Ponto 22	Rio Caratinga	Barra do Cuité	24k 230160 7890178	Ponto 33	rio Manhuaçu	Aimorés, MG	24k 0270455 7843334
Ponto 23	rio Doce	Aimorés, MG	23k 0709520 7726785	Ponto 34	rio Manhuaçu	Aimorés, MG	24k 0261172 7842938
Ponto 24*	Rio Matipó	Raul Soares, MG	23k 0709520 7726785	Ponto 35	rio Guandu	Baixo Guandu, ES	24k 0288291 7828762
Ponto 25	rio Santo Antônio	Naque, MG	23K 0779627 7871089	Ponto 36	rio Doce	Colatina, ES	24k 0327949 7838898
Ponto 26	rio Doce	Resplendor, MG	24k 0263294 7861088	Ponto 37	rio Doce	Linhares, ES	24k 0387897 7853854
Ponto 27	rio Doce	Conselheiro Pena, MG	24k 0242767 7877983	Ponto 38	rio Doce	Linhares, Lagoa Juparanã Mirin, ES	24k 0377681 7861617
Ponto 28	rio Doce	Governador Valadares, MG	23k 813646 7904202	Ponto 39	rio Doce	Linhare e Povoação, ES	24k 0400131 7850752
Ponto 29	rio Suaçuí Grande	Matias Lobato, MG	24K 0202153 7937309	Ponto 40	rio Doce	distrito de Povoação, Foz do rio Doce, ES	24k 0416523 7834814