



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

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

### **3. OBJETIVOS**

O monitoramento ecotoxicológico descrito no presente documento tem como objetivos:

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

### **4. METAS E JUSTIFICATIVAS**

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

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

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

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

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

**Meta 3- Monitoramento ecotoxicológico do ambiente praial.**

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

**Meta 4- Monitoramento ecotoxicológico dos manguezais.**

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

**Meta 5- Monitoramento ecotoxicológico da microbiota.**

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

**Meta 6- Monitoramento ecotoxicológico de aves.**

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

**Meta 7- Monitoramento ecotoxicológico de quelônios e cetáceos.**

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

**5. PRODUTOS**

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

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

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

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

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Áreas de Estudo

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

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

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

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

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

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

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

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

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

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

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

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

## 6.2. Periodicidade

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

## 6.3. Coleta de amostras de água

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



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

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

#### **6.5. Coleta de amostras de sedimentos**

Em cada ponto de coleta no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário (Tabela 1), na foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Tabela 2), bem como no ambiente praias (Tabela 3), serão coletadas amostras de sedimentos com auxílio de pá ou draga do tipo Van Veen, dependendo do local de coleta. Em cada local de amostragem (10 pontos no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário; 21 pontos na foz do Rio Doce e região costeira adjacente; e 10 pontos na região praias), serão coletadas 4 amostras de sedimento. As amostras serão abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento. As amostras serão fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento. Para a análise de metais, as amostras serão coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5 cm) da amostra de sedimento, obtendo-se assim apenas o sedimento superficial. Para cada amostra, serão coletados aproximadamente 50 g de sedimentos, os quais serão armazenados em pote plástico e mantidos congelados até o momento das análises. Em todas as amostras de sedimento serão analisados os seguintes metais: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

#### **6.6. Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água**

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

#### **Água doce**

Matrizes: água bruta e elutriado

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

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

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

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

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

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

Matriz: sedimento

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

### Água salgada

Matrizes: água bruta e elutriato

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

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

Nível trófico 2 - *Echinometra lucunter*

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

Nível trófico 3 - espécie nativa a definir

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

Matriz: sedimento

*Nitokra sp*

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

### 6.7. Coleta de amostras de biota

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **6.8. Avaliação da microbiota na água, sedimentos e corais**

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

#### **6.9. Coleta de amostras de aves**

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

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

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

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

Fonte: Anexo 1, TR4.

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

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

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

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

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), as amostras de quelônios serão tratadas a frio com 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após essa etapa, serão adicionados 5 mL de solução sulfonítrica concentrada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>; v/v) e as amostras serão então aquecidas em banho-maria a 60°C por 2 h, até a solubilização completa da amostra. Os extratos serão resfriados por 15 min, e 10 mL de KMnO<sub>4</sub> (5%) serão adicionados aos extratos. As amostras serão retornadas ao banho-maria (60°C) por 15 min, e serão então resfriadas em repouso, por uma noite. No dia seguinte, o extrato será reduzido com a adição de 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (HONH<sub>2</sub>) a 12%. O extrato final será avolumado com água MilliQ até 14 mL. As leituras serão realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio. A certificação do método de determinação do HgT será feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de peixe) e DORM-4 (músculo de peixe) do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC). Serão usados brancos analíticos em todas as baterias analíticas.

A determinação das concentrações de elementos-traço (As, Cr, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) nas amostras de quelônios será realizada através de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), utilizando-se de um espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Para tal, uma solução de nitrato de paládio (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) será utilizada como modificador químico e, conseqüentemente, adicionada a cada solução a ser analisada. Esta solução será preparada a partir de uma solução padrão de nitrato de paládio, modificador para forno de grafite AAS (Merck No.B9366989 710). O controle de qualidade será efetuado através do uso de materiais certificados de referência (DOLT-5 e DORM-4) do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC).

Para a determinação de compostos organoclorados nas amostras de quelônios, as extrações serão realizadas com aparelhos de Soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 125 mL, os quais serão aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. Será utilizada uma mistura de solventes (hexano e diclorometano; 1:1; v/v). Serão utilizados cerca de 8 g de amostra (peso seco). Os padrões internos de PCB 103 e PCB 198 serão adicionados às amostras. O volume final será reduzido, para dar então prosseguimento à etapa de purificação, com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Santos-Neto *et al.*, 2014). O conteúdo lipídico das amostras será quantificado por gravimetria. Portanto, as concentrações finais dos compostos organoclorados serão normalizadas a partir do conteúdo de lipídios na amostra analisada. As concentrações dos pesticidas e das bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa, com detector de captura de elétrons (GC/ECD). O hidrogênio será utilizado como gás de arraste enquanto o nitrogênio será empregado como gás auxiliar (make up). O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

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



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

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

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

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

As amostras de material biológico serão previamente secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) ultrapuro (Suprapur, Merck) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. O teor de água para cada amostra será obtido. As amostras serão então submetidas à digestão ácida lenta em tubos plásticos tipo Eppendorf, os quais serão devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até a completa digestão das amostras. As amostras contendo o material biológico digerido serão então avolumadas a 1 mL com água tipo MilliQ. No momento das análises, caso necessário, as amostras serão diluídas utilizando-se água tipo MilliQ, visando se adequar as concentrações dos metais nas amostras àquelas presentes nas soluções padrões certificadas utilizadas para calibrar o equipamento. As concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de material biológico, preparadas conforme descrito acima, serão analisadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica de alta resolução. Por sua vez, a análise da concentração de Hg nestas amostras será realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador

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

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

**6.12. Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes**

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

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

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

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

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

#### **Concentração de metalotioneínas**

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

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

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

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

### **Atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

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

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

A preparação das amostras para análise dos parâmetros de calcificação será realizada macerando-se as amostras em nitrogênio líquido e separando-as em alíquotas de 150-200 mg. Para cada análise, as amostras serão homogeneizadas em tampão específico (1:1; peso/volume) para cada ensaio, com o auxílio de um sonificador. As amostras homogeneizadas serão então centrifugadas (10.000 xg, 20 min, 4°C) e o sobrenadante coletado para as análises, sendo imediatamente utilizado para as medidas de atividade enzimática (Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Mg<sup>2+</sup>-ATPase e anidrase carbônica). A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas será realizada baseando-se no método de Bradford.

A determinação da atividade da anidrase carbônica será realizada medindo-se a redução de pH associada à catálise da hidratação do CO<sub>2</sub>, com a correspondente liberação de H<sup>+</sup> (Henry, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras será constituído de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritiotreitól (DTT 1 mM). Para isso, 15 µL do homogeneizado serão adicionados a 3 mL de uma solução de reação composta por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). Em seguida, serão adicionados 280 µL de substrato (água destilada saturada com CO<sub>2</sub>) e o pH registrado a cada 5 s, durante 30 s, com o auxílio de um pHmetro de bancada. Paralelamente, serão realizadas determinações do "branco de reação", onde 15 µL do tampão de homogeneização serão adicionados à solução de reação e ao substrato. Será utilizado o modelo de regressão linear (variável dependente: pH, variável independente: tempo) para determinar a

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

A determinação das atividades da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase será realizada utilizando-se o método descrito por Vajreswari *et al.* (1983), com modificações. O homogeneizado da amostra será preparado utilizando-se tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado será centrifugado (20 min, 10.000 xg, 4°C) e 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante serão utilizados para a análise. O meio de reação utilizado na análise da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase será composto por NaCl (189 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM),  $\text{CaCl}_2$  (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação será realizada a 30°C, por 30 min. Por sua vez, o meio de reação utilizado na análise da atividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase será composto por NaCl (189 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM), EGTA (0,2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação será realizada a 30°C, por 30 min. No início da incubação, ATP (3 mM) e ouabaína (1mM) serão adicionados aos meios de reação. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação será determinada utilizando-se o método colorimétrico (630 nm). Os resultados serão normalizados com base na quantidade de proteínas totais presentes nos homogeneizados e serão expressos em mM Pi/mg proteína/min. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (*Ca-ATPase ELISA Kit* fornecido pela MyBiosource; ou outro kit similar), cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

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

As atividades da lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) serão analisadas em homogeneizados das amostras das brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima. Os homogeneizados das amostras de brânquias e fígado serão realizados por maceração mecânica em mistura contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton x 100. Após centrifugação, o sobrenadante obtido será utilizado para as análises das atividades da LDH e MDH. A avaliação da atividade da LDH será realizada pela mistura de solução de piruvato de sódio (1 mM), KCl (100 mM), tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e NADH (250  $\mu\text{M}$ ) a uma alíquota do sobrenadante de cada homogeneizado de brânquia ou fígado. Para a determinação da atividade da MDH, serão adicionados à alíquota do sobrenadante dos homogeneizados uma solução de ácido oxaloacético (0,4 mM),  $\text{MgCl}_2$  (20 mM), NADH (150  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas serão aqueles descritos por Thuesen *et al.* (2005) e Childress e Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, e adaptada por Ribeiro *et al.* (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas em análise será determinada por espectrofotometria UV em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados será realizada pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas serão expressas em U/mg de proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderão ser utilizados kits comerciais de reagentes (*Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit* e *Malate Dehydrogenase Activity Assay Kit*, fornecidos pela Sigma-Aldrich; ou outros kits similares), cujos princípios de análise também estão baseados em métodos espectrofotométricos.

#### **Atividades de enzimas antioxidantes**

As atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) serão analisadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no item "*Atividades de enzimas do metabolismo energético*". A atividade da CAT será determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), conforme descrito por Beutler (1975). Por sua vez, a atividade da SOD será analisada medindo-se o grau de redução do citocromo C, conforme descrito por McCord e Fridovich (1969). A dosagem de proteínas dos homogeneizados será realizada pelo método de Bradford. As atividades da CAT e da SOD serão expressas em U/mg de proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderão ser utilizados kits comerciais de reagentes, cujos princípios de análise também estão baseados em métodos espectrofotométricos em microplaca (*Catalase Assay Kit* e *Superoxide Dismutase Assay Kit*, fornecidos pela MyBiosource; ou outros kits similares).

### **Peroxidação lipídica**

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

### **Oxidação de proteínas**

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

### **Dano de DNA**

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

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

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

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

Para a avaliação do dano no material genético através do ensaio de micronúcleo serão utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As amostras serão coletadas com seringas (1 mL), munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos aos hemócitos. As amostras serão transferidas para tubos siliconizados, que serão dispostos em microcentrifuga (1.000 rpm, por 5 min), com retirada de 50 µL com micropipeta, colocada junto ao fundo do tubo. Este volume de material será gotejado na lateral da lâmina, sendo então espalhado por esfregaço com outra lâmina. O procedimento será realizado individualmente, com a obtenção de três lâminas/indivíduo, as quais serão secas ao ar e fixadas com solução de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético), por cerca de 20 min, com nova secagem à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão coradas com solução de Giemsa 2%, preparada em tampão fosfato pH 8,0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), também por 20 min. Após este procedimento, as lâminas serão lavadas com água deionizada, secas ao ar e com adesão de lamínulas com Entellan® (Merck). Posteriormente, as lâminas serão examinadas sob microscópio óptico comum, integrado a um sistema de análise de imagens por computador, com contagem das células micronucleadas pelo programa KS300® (Carl Zeiss, Alemanha) ou alternativamente o software livre ImageJ. As três lâminas de cada indivíduo serão avaliadas em aumento de 1.000X, com avaliação de 1.000 hemócitos em cada lâmina, sendo então quantificado o número de células micronucleadas por 1.000 células analisadas (MN‰).

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

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

### Danos morfológicos

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



### **Biomarcadores de desregulação endócrina**

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

### **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANVISA, 2013. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC no 42, de 29 de Agosto de 2013.
- APHA, 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington.
- Babich H, Borenfreund E. 1991. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Applied & Environmental Microbiology* 57: 2101-2103.
- Childress JJ, Somero GN. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology* 52: 273-283.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Brasília, Brasil.
- Covaci A, Koppen G. 2002. Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50–65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. *Chemosphere* 48: 827-832.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23-38.
- Faria FA, Silva-Costa A, Gianuca DM, Bugoni L. 2016. Cocol heron (*Ardea cocoi*) connects estuarine, coastal, limnetic and terrestrial environments: an assessment based on conventional dietary and stable isotope analysis. *Estuaries and Coasts* 39:1271-1281.
- Henry RP, 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: Dodgson SJ, Tashian RE, Gros G, Carters ND (Eds.), *The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics*. Plenum, New York, pp. 119-125.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.
- Nadella SR, Fitzpatrick JL, Franklin N, Bucking C, Smith S, Wood CM. 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 149: 340-348.
- Oakes KD, van Der Kraak GJ. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63: 447-463.
- Péqueux A, Chapelle S. 1982. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and phospholipids in two euryhaline crabs related to changes in the environmental salinity. *Marine Biology Letters* 3: 43-52.

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

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

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

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

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

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

Vajreswari A, Srinivasa Rao P, Kaplay SS, Tulpule PG. 1983. Erythrocyte membrane in rats fed high euristic acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)- and (Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-ATPases. Biochemica Medica 29: 74-84.

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

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

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