

Material Suplementar A1DS1

Anexo 1 – Ambiente Dulcícola

1 ANEXO 1 – METODOLOGIA GERAL – RELATÓRIO ANUAL 2020 (PMBA/FEST-RRDM)

1.1 MALHA AMOSTRAL

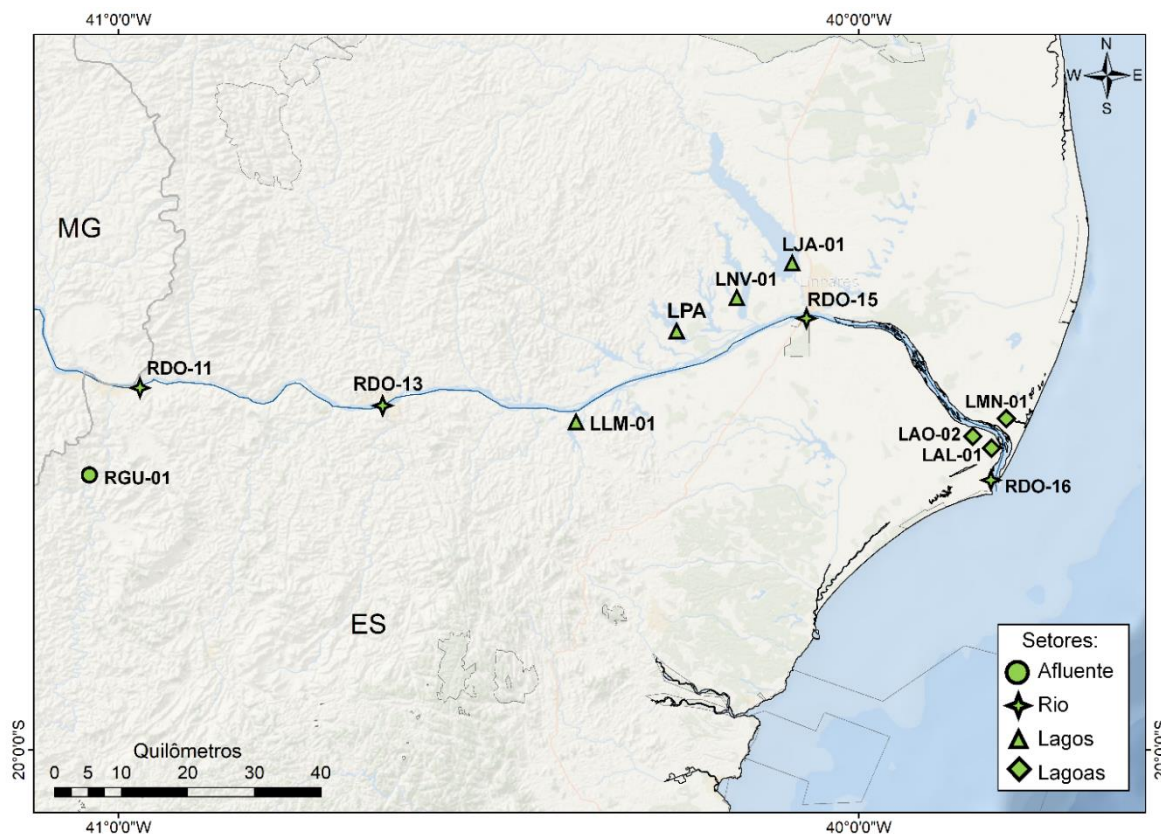
Como estabelecido no Plano de Trabalho do Anexo 1, o monitoramento ecotoxicológico foi realizado sazonalmente (períodos secos e chuvosos) durante o Ano 1 (out/2018 a set/2019) e Período de Transição (out/2019 a mar/2020) do PMBA/Fest-RRDM, em 4 campanhas distribuídas da seguinte forma: campanha 1 (set/out 2018), campanha 2 (jan/fev 2019), campanha 3 (set/out 2019) e campanha 4 (jan/fev 2020). Conforme definido no TR4 e, posteriormente na Nota Técnica nº3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, o monitoramento ecotoxicológico referente ao ambiente dulcícola contemplou amostragens em estações amostrais distribuídas no curso do Rio Doce no Estado do Espírito Santo, seu estuário, um afluente e lagos e lagoas adjacentes ao rio. Amostras de água, sedimento e biota coletadas nos pontos de amostragem estão em conformidade com a autorização para atividades com finalidade científica emitida em 30/08/2018 pelo ICMBio/MMA (no 64261-1). As atividades que envolvem captura, coleta e/ou manipulação de vertebrados possuem autorização da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da FURG (Certificados no. P036/2018 e no. Pq014/2018). As amostras coletadas foram processadas e/ou têm testemunhos devidamente armazenados nos laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande - FURG (Rio Grande, RS), Universidade Federal do Espírito Santo - UFES (São Mateus, ES) e Universidade Federal Fluminense – UFF (Rio de Janeiro, RJ).

Em decorrência de uma proposta de alinhamento das estações amostrais do PMBA/Fest-RRDM com as estações amostrais do PMQQS, o ponto amostral do Rio Doce em Regência (RDR) não foi monitorado a partir do Período de Transição (campanha 3 - set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020). Por outro lado, visando aumentar a representatividade da calha principal do Rio Doce, foram incluídos mais dois pontos no rio, um em Baixo Guandu (RDO-11) e outro em Colatina (RDO-13), além da inclusão do Lago Palmas (LPA), como um possível local de referência para o ambiente lacustre. O detalhamento das estações amostrais, como nome, código da estação e posição geográfica estão apresentados no Quadro 1. Além disso, os pontos podem ser observados também no mapa presente na Figura 1.

Quadro 1 - Estações amostrais da campanha dulcícola referente ao Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM. As coordenadas geográficas (latitude e longitude) das estações amostrais estão apresentadas em UTM Sirgas 2000. *Ponto avaliado apenas durante o ano 1 (campanha 1 – set/out 2018 e campanha 2 – jan/fev 2019). **pontos avaliados apenas durante o Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020).

NOME DA ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO DA ESTAÇÃO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIRGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Rio Guandu	RGU-01	-	7828746,17	288351,08
Lago do Limão	LLM-01	-	7837447,02	355688,84
Lago Nova	LVN-01	-	7855827,03	377287,60
Lago Juparanã	LJP-01	-	7859664,14	385766,88
Rio Doce	RDO-15	-	7853249,98	387144,67
Rio Doce	RDR*	-	7837309,00	410025,62
Lagoa do Areão	LAO-02	-	7835831,65	411472,58
Lagoa do Areal	LAL-01	-	7834176,33	413154,34
Lagoa Monsarás	LMN-01	-	7837161,08	415912,93
Foz do Rio Doce	RDO-16	-	7828234,12	414079,86
Rio Doce (Baixo Guandu)	RDO-11**	-	7841937	288650
Rio Doce (Colatina)	RDO-13**	-	7839122	328395
Lago Palmas	LPA**	-	7848967	370019

Figura 1 - Mapa amostral indicando as estações amostrais dulcícolas monitoradas pelo Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM. A nomenclatura das estações amostrais e as respectivas coordenadas geográficas encontram-se descritas no Quadro 1.



1.2 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

As coletas de água, ao longo da coluna d'água, foram realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal do tipo *Van Dorn*. Em todas as estações amostrais foram coletadas 6 amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL de cada amostra) para a análise das concentrações de metais totais e 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 a análise das concentrações de metais na fração dissolvida. Imediatamente após a coleta, alíquotas das amostras para a determinação das concentrações totais e dissolvidas de metais foram acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas. Em todas as amostras de água foram analisados os seguintes elementos: Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg) e Zinco (Zn). A partir do início do Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019 e campanha 4 – jan/fev 2020) os metais Níquel (Ni) e Alumínio (Al) também passaram a ser determinados nas amostras de água. Por apresentar características químicas intermediárias entre metais e não metais, o Arsênio é classificado como um elemento do grupo dos metalóides. Entretanto, este elemento apresenta um comportamento toxicológico muito semelhante aos elementos metálicos, por esta razão, para fins do presente relatório, o elemento Arsênio foi considerado dentro do grupo dos metais para as análises integradas. Adicionalmente, amostras de água foram coletadas para frascos de diferentes volumes e, imediatamente, congeladas para uso nos testes de toxicidade.

1.3 ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

No momento da coleta das amostras de água, foram realizadas as medidas da temperatura, condutividade elétrica, salinidade, pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetros (YSI Professional Plus). A concentração de carbono orgânico dissolvido foi determinada nas amostras de água filtradas (0,45 µm de malha) utilizando-se um analisador de carbono total (TOC). Os demais parâmetros químicos foram determinados nas amostras de água não filtradas. A concentração de sulfatos foi determinada por meio de um *kit* comercial de reagentes (Vacu-vials Sulfato, CHEMetrics, EUA), baseado no método turbidimétrico (Tabatabai, 1974). A alcalinidade total foi determinada por titulação com solução padrão ácida, empregando-se um kit comercial de reagentes (Teste de Campo Titulométrico de Alcalinidade, Merck Millipore Brazil, Brasil), baseado no método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (concentrações de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ e Na⁺) foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. A concentração de cloretos foi analisada por meio de um *kit* comercial de reagentes (Vacu-vials Cloreto, CHEMetrics, EUA), baseado no método do tiocianato férrico.

1.4 COLETA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO

Em todas as estações amostrais utilizadas para a coleta de água foram coletadas também amostras de sedimento superficial com auxílio de draga do tipo *Van Veen*. Em cada local de amostragem foram coletadas 4 amostras de sedimento. As amostras foram abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento e fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento. Para a análise de metais, as amostras foram coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0 - 5 cm) e obtendo-se apenas o sedimento superficial. Para cada amostra, foram coletados aproximadamente 50 g de sedimento, os quais foram armazenados em frascos plásticos descontaminados e mantidos congelados até o momento das análises. Em todas as amostras de sedimento foram analisados os seguintes elementos: Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg) e Zinco (Zn). Assim, como nas amostras de água, a partir do início do Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019 e campanha 4 – jan/fev 2020), os metais Níquel (Ni) e Alumínio (Al) também passaram a ser determinados nas amostras de sedimento. Adicionalmente, amostras de sedimento foram coletadas para frascos de diferentes volumes e, imediatamente, refrigeradas para uso nos testes de toxicidade.

1.5 COLETA DE AMOSTRAS DE BIOTA

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos biológicos decorrentes da contaminação ambiental por metais/As e consequente acumulação desses metais nos organismos de diferentes níveis tróficos e diferentes habitats, foram realizadas coletas de organismos típicos das regiões monitoradas. Além disto, as amostras biológicas também foram coletadas com o intuito de avaliar os biomarcadores.

No ambiente de água doce, coletou-se amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de quironomídeos, girinos, camarão de água doce e quatro espécies de peixes (espécies originalmente previstas: tucunaré *Cichla sp.*, bagre *Pimelodus maculatus*, curimatá *Prochilodus sp.* e cascudo *Hypostomus affinis*). No ambiente estuarino (calha do Rio Doce próximo à sua foz), amostrou-se fitoplâncton, zooplâncton, camarão e 4 espécies de peixes (espécies originalmente previstas: carapicu *Eucinostomus sp.*, corvina *Pachyurus adspersus*, bicudo *Pomadasys ramosus* e bagre caçari *Genidens genides*). Todavia, não foi possível coletar todas as espécies de peixes previstas no TR4, em todos os pontos amostrais e em número amostral mínimo necessário para as análises de bioacumulação e respostas de biomarcadores. Diante disto, substituiu-se as mesmas por outras espécies de peixes que ocupassem o mesmo habitat e o mesmo nicho trófico (as listas de espécies coletadas estão no *Material Suplementar A1DS2, Quadros 1 e 2*).

Para as coletas de zooplâncton foram realizados arrastos verticais oblíquos com rede tipo WP-2, de 60 cm de diâmetro de boca e malha de 200 µm. Para o fitoplâncton, foram realizados arrastos verticais oblíquos com rede de malha de 60 µm e diâmetro de boca de 60 cm. O material obtido em cada arrasto foi retirado dos copos coletores com auxílio de peneiras e pissetes com água do ponto de coleta. O

material foi filtrado em peneiras de 500 μm para a retirada de peixes e outros organismos ou partículas grandes, e então por uma peneira de 63 μm para concentrar o fitoplâncton. As amostras resultantes da última filtragem foram aliqüotadas em tubos criogênicos devidamente identificados, para análise da concentração de metais e para análise de biomarcadores, e mantidas em nitrogênio líquido até o transporte para a Universidade Federal do Rio Grande, onde foram armazenadas em ultrafreezer à -80° C. Foram realizados no total 5 arrastos para fitoplâncton e 5 arrastos para zooplâncton (15 min de duração cada arrasto).

No caso dos camarões, a coleta foi realizada com utilização de diversos petrechos de pesca, conforme o ambiente (ex: redes de cerco, redes de arrasto). Os animais coletados foram previamente crioanestesiados (~2 min) e o comprimento total (rosto ao telson) foi mensurado. As amostras de hemolinfa e tecidos (brânquias, músculo e hepatopâncreas) foram coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, para posterior análise de metais, biomarcadores e íons. As amostras foram acondicionadas em microtubos ou tubos tipo Falcon, previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. As amostras coletadas para as análises de metais e íons foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas até o laboratório, onde foram devidamente armazenadas anteriormente às análises. A sequência dos procedimentos realizados encontra-se abaixo:

A hemolinfa foi coletada utilizando-se agulha (0,45 ou 0,75 mm) acoplada à seringa de insulina (1 mL). Para análise de íons, a seringa foi previamente lavada 3 vezes com solução anticoagulante para hemolinfa de crustáceos (0,45 M Cloreto de Sódio [NaCl]; 0,1 M Glicose [C₆H₁₂O₆]; 94 mM Citrato de Sódio [Na₃C₆H₅O₇.H₂O]; 26 mM Ácido Cítrico [C₆H₈O₇]; 7,85 mM EDTA dissódico [C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O]; pH 4,6). Em todos os casos, os materiais utilizados, como a seringa e o anticoagulante, foram mantidos gelados, a fim de evitar a coagulação da hemolinfa. Para a coleta de hemolinfa em camarões, a seringa foi inserida na membrana entre a região dorsal do cefalotórax e abdômen, tomando-se o cuidado para não coletar a água da cavidade branquial. O sobrenadante (plasma) obtido a partir de centrifugação (Minicentrífuga Mylabor; 1 min; velocidade fixa de 4.656 g) foi transferido para um criotubo de 2 mL e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido. Após a centrifugação da hemolinfa e separação do plasma, o pellet foi armazenado em criotubos de 2 mL (n= 6) em nitrogênio líquido para posterior análise de Sítios AP (danos no DNA) em laboratório. Para a coleta de tecidos de camarões, as brânquias foram cuidadosamente dissecadas com o auxílio de microtesoura. O tecido branquial de cada indivíduo foi destinado para a análise das concentrações de As e metais (n= 6), análise de lipoperoxidação (n= 6) e atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (n= 6). O tecido branquial destinado à atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi imediatamente preservado em tampão SEI (1:10). Os criotubos (2 mL) contendo as brânquias foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. Após a retirada da carapaça do cefalotórax dos camarões, o hepatopâncreas de cada indivíduo foi dissecado, acondicionado em criotubo (2 mL) e destinado à análise das concentrações de As e metais (n = 6). Uma porção do tecido hepatopancreático de outro indivíduo foi coletada, acondicionada em criotubo (2 mL) e destinada à análise da concentração de metalotioneínas (n= 6), enquanto a outra porção foi coletada, acondicionada em criotubo (2 mL) e destinada à análise da lipoperoxidação (n= 6).

Todo o material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Após a retirada da carapaça dos camarões, o músculo abdominal foi coletado, acondicionado em criotubo (2 mL) e destinado à análise das concentrações de metais ($n=6$) e concentração de proteínas carboniladas ($n=6$). Durante a coleta foram retirados o cordão nervoso ventral e o intestino do animal antes de congelar o músculo.

A coleta de girinos de anfíbios foi realizada através de arrastos com rede tipo WP- 2 de 60 cm de diâmetro de boca e malha de 200 μm . Após a captura, com auxílio de puçás, os animais foram eutanasiados em hidrocloreto de benzocaína (500 mg/L). Todas as amostras (pools) foram armazenadas em criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

Para a amostragem de peixes nas drenagens com maior volume de água ao longo da porção capixaba do Rio Doce, foram utilizadas redes de-emalhar de diferentes malhas (15, 25, 35, 50 e 60 mm entre nós adjacentes), cada qual com 20 m de comprimento. Em cada ponto de amostragem, foram armados três conjuntos de redes, com redes de todas as malhas, ao final da tarde, sendo os mesmos retirados na manhã do dia seguinte, ficando, portanto, na coluna d'água por aproximadamente 12 h. As coletas foram realizadas com o auxílio de pescadores profissionais locais, geralmente associados a colônias e associação de pescadores, com o apoio de barcos a remo e a motor. Além das redes de-emalhar, foram utilizadas rede de arrasto, peneiras e tarrafa (malha 20 mm). As coletas foram realizadas sem esforço padronizado, possibilitando explorar todos os tipos de ambientes disponíveis (corredeiras, poços, locais, etc.) na área estudada, a fim de se obter o número amostral necessário de amostras para as análises das concentrações de As e metais, bem como de biomarcadores. As peneiras foram posicionadas perpendicularmente ao substrato, com a boca voltada para montante, sendo o substrato à sua frente revolvido com os pés e mãos, com o objetivo de desalojar os peixes, os quais eram conduzidos pela corrente para dentro da peneira. Já a rede de arrasto foi utilizada por duas pessoas, cada qual em uma extremidade, posicionando-a paralelamente à margem e percorrendo-se todo o espaço à sua frente, de tal forma que todos os peixes que se abrigavam na vegetação marginal pudessem ser capturados pela rede. Os trechos foram percorridos de jusante a montante (contra o fluxo da água) para evitar a ressuspensão do sedimento, o que pode afugentar os animais.

Após a captura, os peixes foram identificados, pesados (g) e medidos (mm). Para as análises das concentrações de As e de metais, bem como dos biomarcadores, os espécimes foram, logo após a coleta, mantidos em caixas plásticas com água do próprio local com aeração constante. Após isso, foram anestesiados (benzocaína diluída em água; 0,25 mg/L), pesados (g) e medidos (mm). Após anestesia, os animais foram dissecados e coletados os tecidos/órgãos alvo, conforme descrito a seguir:

A coleta de sangue foi realizada através de punção da veia caudal, utilizando-se agulha e seringa de insulina (1 mL) devidamente lavada com anticoagulante (heparina). A agulha foi inserida próxima ao pedúnculo caudal até alcançar a coluna vertebral para se ter acesso ao vaso sanguíneo. Após a coleta, as amostras de sangue foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL. Uma alíquota de 15 μL do sangue de cada animal foi dispensada em três lâminas de vidro, limpas e devidamente identificadas, para a confecção de esfregaços sanguíneos e posterior análise de danos no DNA (Teste do Micronúcleo). As lâminas permaneceram secando durante a noite, em caixas próprias protegidas da luz e calor, e então fixadas em metanol absoluto por 10 min. O restante do sangue total foi

imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de danos oxidativos no DNA, com base na quantificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP). Para a determinação das concentrações iônicas plasmáticas e biomarcadores de desregulação endócrina (vitelogenina e proteína da zona radiata), outras 6 amostras de sangue total foram retiradas do grupo de peixes destinados à análise das concentrações de As e metais ($n=6$). Logo após a coleta, 5 μL de um coquetel inibidor de proteases (Sigma Aldrich®) foi adicionado a cada 100 μL de amostra e estas foram imediatamente centrifugadas em microcentrífugas portáteis (4.600 g, 2 min), para a separação do plasma sanguíneo que, por sua vez, foi imediatamente separado e congelado em nitrogênio líquido. Após a punção sanguínea, os peixes foram eutanasiados com dose letal de hidrocloreto de benzocaína (500 mg/L).

Após a coleta de sangue, as brânquias foram cuidadosamente dissecadas da cavidade opercular, evitando-se ao máximo tocar os filamentos branquiais com auxílio de pinça e tesoura. Os arcos branquiais foram separados em placas de Petri contendo solução fisiológica para peixes. O segundo arco branquial direito foi lavado delicadamente com pincel macio e solução fisiológica para a retirada do excesso de sangue e muco. Após isso, foi fixado em solução de Bouin (6-8 h) para posterior análise morfológica. Após o período de fixação, a solução fixadora foi substituída por álcool 70%, o qual foi trocado diariamente, até a completa remoção do fixador. Os arcos branquiais restantes foram acondicionados em criotubos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após a dissecação das brânquias, a cavidade abdominal dos peixes foi exposta, utilizando-se uma tesoura. A seguir, o fígado dos peixes foi dissecado com o auxílio de pinças curvas, tentando-se remover os lobos hepáticos da forma mais íntegra possível. O órgão foi dividido para as análises histológicas e de biomarcadores. Para as análises histológicas, o órgão foi fixado em solução de Bouin (6-8 h) e posteriormente conservado em álcool 70%. Para a avaliação dos biomarcadores bioquímicos, as amostras foram acondicionadas em criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Por fim, uma amostra de músculo da região dorsal (musculatura hipoaxial) foi dissecada removendo-se as escamas e a pele. As porções de músculo foram acondicionadas em criotubos e estes congelados em nitrogênio líquido. Após a dissecação dos animais em campo, a carcaça foi descartada no local de coleta (campo).

1.6 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA EM ÁGUA E SEDIMENTO

Para o monitoramento da comunidade microbiana total, amostras de água e sedimento foram coletadas, em triplicata, em cada ponto de coleta. A análise da microbiota total em amostras de água, sedimento e associada aos corais, deu-se 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 foram geradas e processadas, utilizando o programa Mothur v.1.33. A análise das sequências obtidas permitiu a avaliação do core microbiano e os microrganismos presentes nas diferentes amostras, nos diferentes pontos e nas diferentes campanhas, correlacionando estatisticamente os resultados de diversidade microbiana obtidos com as demais análises realizadas no programa de monitoramento. Essa avaliação é importante não apenas para indicar possíveis

alterações ambientais temporais e/ou pontuais, como ainda para apontar bioindicadores microbianos específicos da presença de metais nas diferentes áreas amostradas, que podem ser rastreados em áreas adjacentes.

1.7 ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA, SEDIMENTO E BIOTA

A análise das concentrações dos elementos Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al) nas amostras de água, sedimento e biota foram realizadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Por sua vez, realizou-se a análise da concentração de Mercúrio (Hg) nestas amostras pelo método de vapor frio, utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica (AAS) ou de fluorescência atômica (AFS; Mercur; Analytik-Jena). As concentrações totais e dissolvidas dos metais nas amostras de água foram expressas em µg/L. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, foram realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, analisamos "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras foram igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, utilizou-se as soluções-padrão certificadas do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC) para os metais analisados nos diferentes tipos de águas (NASS-6: água marinha; SLEW-3: água salobra; SLRS-6: água doce).

Com relação ao sedimento, a análise de metais e As realizadas nas campanhas 1 (set/out 2018) e 2 (jan/fev 2019) foram baseadas no método de Lana, et al. (2006) com modificações. O método consiste em pesar em um frasco de plástico uma alíquota de 1g do sedimento coletado, com posterior lavagem do conteúdo com água ultrapura para eliminar interferentes salinos. Após, o sedimento foi seco em estufa à 60° C até obtenção de peso seco constante e, então, submetido ao processo de digestão. Para tal, na amostra seca, foram adicionados 10 mL de uma mistura de ácido nítrico: ácido clorídrico (1:1), o frasco agitado levemente em vórtex e mantido tampado em estufa a 60°C por 24 h e/ou até que não houvesse liberação de vapores amarelados e o resíduo sólido se tornasse translúcido. A solução resultante foi centrifugada a 3.000 g por 10 min, sendo que o precipitado foi descartado. Uma alíquota do extrato foi diluída e transferida para o vial do amostrador automático do FG-EAA para a determinação das concentrações de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Mn e Zn. Outra alíquota do extrato foi diluída para a determinação de Hg. Para tanto, em um volume de 5 mL de extrato diluído da amostra foram adicionadas 3 gotas da solução de permanganato de potássio 5%. A mistura foi então transferida para o vial do amostrador automático do EFA-GVF para a determinação da concentração de Hg. Nas campanhas 3 (set/out 2019) e 4 (jan/fev 2020), as amostras de sedimento foram congeladas e liofilizadas. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de extração conforme EPA 3051A que, resumidamente, consistiu na pesagem de 0,25g de sedimento macerado (gral e pistilo de ágata), adição de 10 ml de HNO₃ Suprapur Merck e aquecimento em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras foram centrifugadas, o material precipitado foi descartado e o extrato foi diluído. Uma alíquota do extrato foi transferida para o vial do amostrador automático do FG-

EAA para a determinação das concentrações de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Mn e Zn e outra alíquota do extrato foi separada para a determinação de Hg com adição de 3 gotas da solução de permanganato de potássio 5% na amostra. A mistura foi, então, transferida para o vial do amostrador automático do EFA-GVF para a determinação da concentração de Hg. De fato, as alterações nas metodologias aplicadas no Ano 1 e no Período de Transição resumem-se ao procedimento de preparo da amostra.

As amostras de material biológico foram previamente secas em estufa (45-60°C) até atingirem peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO₃) ultrapuro (Suprapur®, Merck) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico e, assim, o teor de água, para cada amostra, calculado. Dessa maneira, submeteu-se as amostras à digestão ácida lenta em tubos plásticos tipo *eppendorf*, os quais foram devidamente lacrados e mantidos em estufa (45-60 °C) até a completa digestão das mesmas. As concentrações dos elementos no material biológico foram expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido) ou µg/g de peso seco (mg/kg de peso seco).

1.8 ANÁLISES DE BIOMARCADORES

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 ou 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 foram analisados de forma seletiva nas amostras de plâncton, 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 e danos morfológicos) nos respectivos tecidos e organismos coletados. As metodologias empregadas para as análises dos biomarcadores listados no

Quadro 2 encontram-se descritas abaixo. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises e de precisão e reprodutibilidade dos resultados, sempre que possível, foram utilizados *kits* comerciais de reagentes específicos que utilizam metodologia semelhante àquelas descritas abaixo, para a determinação dos respectivos biomarcadores.

Quadro 2 - Lista dos biomarcadores analisados nas amostras de organismos coletados nas diferentes áreas do monitoramento dulcícola.

Amostra biológica	Biomarcador (classificação: exposição/efeito)
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)
Hemolinfa de camarões	Composição iônica hemolinfática (efeito) Danos de DNA (efeito)
Brânquias de camarões	Atividade da Na,K-ATPase (efeito) Peroxidação lipídica (efeito)
Hepatopâncreas de camarões	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Sangue de peixes	Composição iônica plasmática (efeito) Danos de DNA (efeito) Desreguladores endócrinos (efeito)
Brânquias de peixes	Atividade de enzimas antioxidantes (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Fígado de peixes	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Atividade de enzimas antioxidantes (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Músculo de camarões e peixes	Oxidação de proteínas (efeito)

1.8.1 Concentração de metalotioneínas (MT)

A determinação da concentração de MT foi realizada por meio de um kit comercial de reagentes (Fish Metallothionein ELISA Kit, fornecido pela MyBiosource), cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca. Os procedimentos analíticos para determinação da concentração das MT seguiram aqueles descritos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g MT/mg}$ proteína.

1.8.2 Atividade da Na^+, K^+ -ATPase (NKA)

Preparou-se as amostras de material biológico para a determinação da atividade da NKA com base nos procedimentos descritos por Péqueux e Chapelle (1982), onde as amostras foram homogeneizadas em tampão SEI (sacarose - Imidazol em pH 7,6) e centrifugadas (5.000 rpm, 5 °C, por 5 min). O sobrenadante obtido foi coletado para determinação da atividade da NKA, a qual foi determinada utilizando-se o método colorimétrico. Para tal, foram usados 100 μL do sobrenadante do homogeneizado, onde foram adicionados 2,5 mL de uma solução salina “A” contendo 77 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 6 mM de MgCl_2 e 3 mM de ATP. O pH da solução foi ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras foram incubadas durante 60 min a 25°C no escuro. A mesma reação foi realizada com 100 μL de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina “B” contendo 83 mM de NaCl, 6 mM de MgCl_2 , 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína. Ambas as reações ocorreram por 1 h, quando então foram paradas pela adição de ácido tricloroacético 50%. A quantidade de fósforo produzido em

cada reação foi determinada utilizando-se um *kit* de reagentes específicos para a determinação do fósforo e a leitura foi realizada a 620 nm. A diferença na produção de fósforo entre as duas reações foi então considerada como sendo aquela atribuída à atividade da NKA. A concentração da proteína no homogeneizado, determinada colorimetricamente, com base no método de Bradford, usando-se albumina de soro bovino como padrão. Logo, a atividade da enzima foi expressa em mmoles Pi/mg proteína/hora.

1.8.3 Composição iônica corporal, hemolinfática ou plasmática

Para a determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados apanhados foram rapidamente (30 s) lavados em água tipo MilliQ, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa (70°C), determinou-se o peso seco do material e, o mesmo foi digerido em ácido nítrico 65% (SupraPur®, Merck). A partir das amostras digeridas de microinvertebrados, da hemolinfa dos camarões e do plasma dos peixes previamente coletados, as amostras foram apropriadamente diluídas para a análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), a qual foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. Por sua vez, a concentração de cloretos foi analisada, com auxílio de um *kit* comercial, pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Os resultados foram expressos em mg/g de peso úmido. No que se refere à composição iônica hemolinfática e plasmática, os resultados foram expressos em mg/L.

1.8.4 Atividade das enzimas do metabolismo energético

As atividades da lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) foram analisadas em homogeneizados das amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento dulcícola. Os homogeneizados foram realizados por maceração mecânica em mistura de tampão fosfato de potássio pH 7,46 e inibidor de protease. Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi utilizado para as análises das atividades da LDH e MDH. A avaliação da atividade de LDH foi realizada através do *kit* comercial Desidrogenase Láctica LDH UV® fornecida pelo Bioclin®. Para a determinação da atividade da MDH foram adicionados aos sobrenadantes dos homogeneizados uma solução contendo ácido oxaloacético (0,4 mM), MgCl₂ (20 mM), NADH (150 µM) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas são aqueles descritos pelo fabricante Bioclin® 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 foi determinada por espectrofotometria UV à 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados deu-se pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades enzimáticas/mg de proteína.

1.8.5 Atividade de enzimas antioxidantes

Analisou-se as atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no item acima. A atividade da CAT foi determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conforme descrito por Aebi (1984). Por sua vez, a atividade da SOD foi medida através da taxa de inibição da auto-oxidação

do pirogalo, de acordo com o protocolo de Marklund e Marklund (1974). A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados deu-se pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades enzimáticas/mg de proteína.

1.8.6 Lipoperoxidação (LPO)

A LPO foi determinada no material biológico utilizando-se um método espectrofotométrico em microplaca, seguindo as recomendações do *kit* comercial TBARS Assay *Kit*, fornecido pela Chayman Chemical. 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. A fluorescência gerada foi medida utilizando-se um espectrofluorímetro (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm). Os dados foram calculados com base em uma curva construída com soluções padrão de MDA, sendo os resultados normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, o qual foi determinado utilizando-se o método de Bradford e expressos em nmol MDA/mg proteína.

1.8.7 Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram determinados de acordo com um *kit* comercial de reagentes *OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay*, fornecido pela MyBiosource. Durante o ensaio, as proteínas carboniladas (oxidadas) foram inicialmente derivatizadas com um fluoróforo específico que se liga ao grupo carbonila da proteína na proporção de 1:1. Após, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) e o fluoróforo livre removido por meio da lavagem do precipitado proteico com acetona. Após, a solubilização do precipitado proteico em hidrócloro de guanidina, a absorbância do produto proteína-fluoróforo foi determinada fluorimetricamente (emissão: 485; excitação: 538 nm) e o conteúdo de proteínas carboniladas calculado. Os resultados foram expressos em nmol PC/mg proteína.

1.8.8 Danos de DNA

O TR4 estipula a realização de, pelo menos, duas das cinco metodologias diferentes previstas 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). Considerando que todas estas metodologias estão associadas ao mesmo biomarcador de efeito (danos ao DNA) e, portanto, fornecem dados semelhantes, as amostras foram testadas através de duas técnicas com alta sensibilidade: a análise de sítios AP e o teste do micronúcleo (MN).

Para a análise de sítios AP (sítios apurínicos/apirimídicos) no material genético, o DNA genômico foi previamente isolado utilizando-se um *kit* de reagentes para isolamento de DNA (Wizard® Genomic DNA Purification *Kit*, fornecido pela Promega Corporation). A análise propriamente dita de sítios AP foi realizada, utilizando-se uma sonda capaz de reagir com o grupo aldeído destes sítios, a qual foi detectada por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para tal, foi 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 foram expressos em sítios AP/10⁵ pares de bases (bp).

Para a avaliação do dano no material genético através do teste de micronúcleo (MN), foram utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante as campanhas conforme descrito acima. Tais amostras foram coletadas com seringas (1 mL) munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos às células e transferidas para tubos e centrifugados em microcentrífuga (1.000 rpm, por 5 min), com retirada de 50 µL com micropipeta, colocada junto ao fundo do tubo. Este volume de material foi gotejado na lateral da lâmina, sendo espalhado por esfregaço com auxílio de outra lâmina. O procedimento foi realizado individualmente, com a obtenção de três lâminas/indivíduo, as quais foram secas ao ar e fixadas com solução metanol por cerca de 20 min, com nova secagem em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 2%, preparada em tampão fosfato pH 8,0 (Na₂HPO₄; KH₂PO₄), também por 20 min. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas com água deionizada, secas ao ar e montadas com lamínulas e Entellan® (Merck®). Posteriormente, examinou-se as lâminas sob microscópio óptico comum e as células micronucleadas foram contadas. As três lâminas de cada indivíduo foram avaliadas em aumento de 1000 x, com avaliação de 1000 células em cada lâmina, sendo, então, quantificado o número de células micronucleadas por 1000 células analisadas (frequência em %). Cabe ressaltar que, devido às dificuldades metodológicas enfrentadas no campo, durante o processamento das lâminas de hemolinfa, as mesmas não puderam ser devidamente analisadas, visto o reduzido número de hemócitos e a baixa integridade estrutural destas células, o que inviabilizou a apresentação do resultado de MN para as espécies de crustáceos coletadas pelo Anexo 1 nos distintos ambientes monitorados.

1.8.9 Danos morfológicos

Efeitos histopatológicos foram avaliados nas amostras de brânquias e fígado dos peixes. Fragmentos de fígado e brânquias foram imersos em solução de Bouin por 8 h, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. O material foi seccionado em micrótomo rotativo. As secções obtidas foram coradas com hematoxilina/eosina e tricômio de Mallory. Algumas lâminas foram submetidas à técnica de coloração PAS, para isso, foram banhadas em ácido periódico 1% por 10 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff, por 20 min. Em seguida, efetivou-se 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. As alterações nos fígados e brânquias foram determinadas de acordo com o método proposto por Bernet e colaboradores (1999). Esse método baseia-se na relevância patológica e na extensão das lesões observadas nos órgãos analisados. As alterações foram classificadas em cinco padrões de reação, onde cada lesão possui um grau de importância. O Índice do Órgão (Iorg) representa o grau de dano apresentado pelo órgão e foi calculado pela fórmula: $Iorg = \sum rp \sum alt (a \times w)$, onde: rp = padrão de reação, alt = alteração, a = extensão da lesão e w = grau de importância. Já o Índice de Reação (Irp) avalia a gravidade das alterações identificadas e foi obtido pelo somatório do produto da multiplicação

do tamanho da lesão pela relevância patológica ($lrp = \sum (a \times w)$, onde rp = padrão de reação, alt = alteração, a = extensão da lesão e w = grau de importância).

1.8.10 Biomarcadores de desregulação endócrina

Também foram realizadas análises de biomarcadores de desregulação endócrina, vitelogenina e proteínas da zona radiata, em amostras de plasma sanguíneo dos peixes coletados durante o monitoramento. Para tanto, foi 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 o método espectrofotométrico *ELISA* em microplaca.

1.9 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Ensaio ecotoxicológicos foram realizados no âmbito do PMBA/Fest-RRDM para classificar amostras de água e sedimento, coletadas na porção capixaba do Rio Doce, quanto a sua toxicidade, cumprindo com o disposto no TR4. Os pontos de amostragem nas campanhas 3 (set/out 2019) e campanha 4 (jan/fev 2020) foram: RGU-01 e RDO-11, afluente e calha do Rio Doce, respectivamente, localizados em Baixo Guandu, RDO-13, situado na calha do Rio Doce em Colatina e RDO-16 localizado na porção estuarina do Rio Doce. Destes pontos, o RDO-11 e RDO-13 foram incluídos na malha amostral para ensaios de toxicidade a partir do Período de Transição, mediante aprovação da CTBio (Nota Técnica no 8/2019/CTBio/DIBIO/ICMBio [22/03/2019]) (Quadro 3). A avaliação toxicológica das amostras de água, elutriado de sedimento e sedimento total, coletadas, armazenadas e preparadas segundo a norma da ABNT NBR 15469, deu-se por meio de ensaios normatizados com organismos bioindicadores de diferentes níveis da cadeia trófica, incluindo microalgas, microcrustáceos e peixes em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 1). Para o cálculo do índice de toxicidade, levou-se em consideração a severidade da resposta observada (Quadro 4) e sensibilidade do organismo testado (Quadro 5). As respostas subletais foram classificadas como menos severas e a letalidade como mais severa; enquanto os organismos mais sensíveis foram valorizados, recebendo maior número na escala de sensibilidade. A valorização das espécies mais sensíveis é importante para que o impacto não seja subestimado. Os valores de toxicidade foram usados para classificar as amostras desde não-tóxicas a altamente tóxicas (Tabela 2). Vale lembrar que, para cada ponto amostral, esta classificação foi feita separadamente para água e sedimento, e levou em consideração a média dos valores de toxicidade resultantes dos diferentes ensaios realizados com as matrizes ambientais. O mesmo procedimento de classificação foi usado para o Ano 1 e Período de Transição para os ambientes dulcícola e marinho.



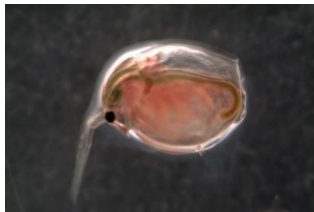



Com relação aos ensaios, realizamos testes agudos e crônicos com os seguintes organismos: a microalga *Raphidocoeles subcapitata* (ABNT NBR 12648), os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* (ABNT NBR 13373), *Daphnia magna* (agudo - ABNT NBR 12713 e crônico - OECD 211) e *Hyalella* sp (ABNT NBR 15470), e peixes da espécie *Danio rerio* nos estágios larval (ABNT NBR 15499) e adulto (ABNT NBR 15088). É importante ressaltar, que no Período de Transição (set/out de 2019 e jan/fev de 2020) não foram realizados ensaios com embriões de *D. rerio* (FET TEST, OECD 236), com anuência

prévia da CTBio, em função dos resultados terem sido inconclusivos para o Ano 1 (Nota Técnica no 8/2019/CTBio/DIBIO/ICMBio [22/03/2019]). Além disso, incorporamos o ensaio crônico com *C. dubia*, em substituição ao ensaio com *D. magna* crônico (ambos os ensaios foram propostos no Plano de Trabalho). Os ensaios são equivalentes do ponto de vista ecotoxicológico, com o de *C. dubia* apresentando a vantagem de avaliar a toxicidade crônica de forma mais rápida e, portanto, ser mais comumente utilizado. Enquanto os testes semicrônicos com *C. dubia* tem duração de 7 dias, o ensaio crônico com *D. magna* dura 21 dias, porém em ambos se considera a reprodução (número de neonatos) dos cladóceros representativos do zooplâncton (Tabela 1).

Quadro 3: Pontos amostrais no Rio Doce e estuário onde foram coletadas amostras de água e sedimento usadas para os testes de toxicidade realizados no Ano 1 (campanha 1 – set/out 2018 e campanha 2 – jan/fev 2019) e Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019 e campanha 4 – jan/fev 2020).

AMBIENTE	ANO 1	PERÍODO DE TRANSIÇÃO	ALTERAÇÃO DE MALHA AMOSTRAL
Dulcícola	RGU-01 RDO-16	RGU-01 RDO-11 RDO-13 RDO-16	Inclusão das estações RDO-11 e RDO-13

Tabela 1: Resumo ensaios de toxicidade realizados com amostras da malha amostral dulcícola do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

Informação	Microalga	Crustáceo	Crustáceo	Crustáceo	Peixe	Peixe
Espécie	 <i>Raphidocelis subcapitata</i> ¹	 <i>Ceriodaphnia dubia</i> ² (cladócero)	 <i>Daphnia magna</i> ³ (cladócero)	 <i>Hyalella spp</i> ³ (anfípoda)	 <i>Danio rerio</i> (larva) ³	 <i>Danio rerio</i> (adulto) ⁴
Procedência do organismo	Coleção de Cultivo de Microalgas Dulciaquícolas (CCMD) – CH012 – ICB/FURG	Fornecedor Comercial	Laboratório de Toxicologia do ICB/FURG	Laboratório de Toxicologia do ICB/FURG	Biotério Aquático do ICB/FURG	Fornecedor comercial
Matriz	Água Superficial/Elutriato de Sedimento	Água Superficial/Elutriato de Sedimento	Água Superficial/Elutriato de Sedimento	Sedimento Bruto	Água Superficial/Elutriato de Sedimento	Água Superficial/Elutriato de Sedimento
Tipo do teste	Crônico	Semicrônico	Agudo/Crônico	Agudo/Crônico	Crônico	Agudo
Método	ABNT NBR 12648	ABNT NBR 13373	ABNT NBR 12713	ABNT NBR 15470	ABNT NBR 15499	ABNT NBR 15088
Duração do Ensaio	72 h	7 dias	48 h/21 dias	10 dias	7 dias	48 h

Informação	Microalga	Crustáceo	Crustáceo	Crustáceo	Peixe	Peixe
Indicador de toxicidade	Inibição da multiplicação das algáceas	Mortalidade/Número de neonatos viáveis	Mortalidade/Número de neonatos viáveis	Mortalidade/Peso	Mortalidade	Mortalidade

Legenda: ¹ <https://alchetron.com/Raphidocelis-subcapitata>; ² <http://cfb.unh.edu>; ³ Acervo do projeto; ⁴ <http://zfin.org/>.

Quadro 4: Índice de severidade atribuído de acordo com severidade da resposta observada nos ensaios de toxicidade. O parâmetro mais tóxico é classificado com maior valor.

Resposta Observada	Índice
Letal	2
Subletal (desenvolvimento, crescimento, fecundação e reprodução)	1

Quadro 5: Índice de sensibilidade dos organismos de acordo com os modelos biológicos usados nos ensaios de toxicidade. Os valores são diretamente relacionados à sensibilidade dos organismos, sendo, portanto, o maior valor atribuído aos organismos mais sensíveis, e o menor valor aos menos sensíveis (mais tolerantes).

Organismo-teste	Índice de Sensibilidade
Plâncton (microalgas, microcrustáceos, embriões e larvas de peixes)	3
Peixes juvenis	2
Peixes adultos	1

Tabela 2: Classificação da amostra com relação ao valor de toxicidade.

Valor de Toxicidade	Classificação da amostra
>100	Altamente tóxica
51 - 100	Tóxica
26 - 50	Moderadamente tóxica
2 - 25	Levemente tóxica
≤1 ou NE	Não tóxica

Fonte: Adaptado de Bulich, 1982.

1.9 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. 1984. **Catalase *in vitro***. In: Methods in enzymology. Academic Press, p. 121-126.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Jan, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Jan, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Jan, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Jan, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15469: Ecotoxicologia aquática – preservação e preparo de amostras. Rio de Jan, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15470: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda e crônica – método de ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda) em sedimentos. Rio de Jan, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15499: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com peixes. Rio de Jan, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15469: Ecotoxicologia aquática – preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2015.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. 1999. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution**. Journal of fish diseases, 22(1): 25-34.
- BULICH, A. A. 1982. **A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples**. Process biochemistry, 17(2): 45-47.
- CHILDRESS, J. J., SOMERO, G. N. 1979. **Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts**. Marine Biology, 52: 273-283.
- HENRY R. P. 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.
- LANA, P.C., BIANCHINI, A., RIBEIRO, C., NIENCHESKI, L.F.H., FILLMANN, G., SANTOS, C.S.G. **Uso e Apropriação de Recursos Costeiros, Grupo Temático: Biodiversidade e Qualidade Ambiental. Avaliação Ambiental de estuários brasileiros: aspectos metodológicos**. Capítulo 4.

Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados. 4.2. Determinação de metais traço. 4.2.3. Amostragem, preparação e análise de metais traço – sedimentos. Pag 79.

MARKLUND, S., MARKLUND, G. 1974. **Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase.** European journal of biochemistry, 47(3): 469-474.

NADELLA, S. R., FITZPATRICK, J.L., FRANKLIN, N., BUCKING, C., SMITH, S., WOOD, C. M. 2009. **Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon.** Comparative Biochemistry and Physiology C 149: 340-348.

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

RIBEIRO, A. C., BATISTA, M. T. O., RODRIGUES JR, E., DE OLIVEIRA, M. F., VANI, G. S., RODRIGUES, E., SUDA, C. N. K. 2015. **Atividades de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadoras de impacto ambiental.** Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science, 10(4): 793-803.

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

VAJRESWARI, A., SRINIVASA, R. P., KAPLAY, S. S., TULPUL, P. G. 1983. **Erythrocyte membrane in rats fed high euricic acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, and (Na⁺,K⁺)- and (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPases.** Biochemica Medica 29: 74-84.

WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M., PEAKALL, D. B. 1996. **Principles of Ecotoxicology.** Londres: Taylor & Francis. 321 pp.