

# **Material Suplementar A1CS1**

## **Anexo 1 – Ambiente Costeiro**

# 1 ANEXO 1 – METODOLOGIA GERAL DO AMBIENTE COSTEIRO - RELATÓRIO ANUAL 2020 (PMBA/FEST-RRDM)

## 1.1 MALHA AMOSTRAL

Conforme definido no TR4 e, posteriormente, na Nota Técnica nº3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, o monitoramento ecotoxicológico do ambiente costeiro foi realizado sazonalmente (inverno/período seco e verão/período chuvoso) a partir da análise de amostras de água, sedimento e biota coletadas durante o 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).

A área de abrangência do monitoramento químico e biológico das praias ao longo do litoral se deu entre os municípios de Aracruz/ES e São Mateus/ES. Foram estabelecidas 10 estações amostrais ao longo deste litoral (Quadro 1 e Figura 1). As estações ao longo da planície do Rio Doce estão localizadas na área da Reserva Biológica de Comboios, no litoral de Aracruz, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz. As estações amostrais avaliadas no ambiente praias foram Aracruz 1 - Refúgio (ARR) e Aracruz 2 - Putiri (ARP) localizadas ao sul da foz do Rio Doce, Doce Sul 1 - Barra do Riacho (DSB), Doce Sul 2 - Comboios (DSC), Doce Sul 3 - Regência (DSR) e Doce Norte 1 - Povoação (DNP) localizadas na foz do Rio Doce, e Doce Norte 2 – Vila de Cacimbas (DNC), Doce Norte 3 - Pontal do Ipiranga (DNPI), Doce Norte 4 - Urussuquara (DNU) e Doce Norte 5 - Guriri (DNG), localizadas ao norte da foz do Rio Doce. Cabe destacar que o ponto DSB não foi amostrado no Período de Transição.

Quadro 1 - Estações amostrais referente monitoramento de praias realizado pelo Anexo 1. Coordenadas geográficas apresentadas em UTM Sirgas 2000. Revis: Refúgio de Vida Silvestre; ARIE: Área de Relevante Interesse Ecológico.

ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Aracruz 1 - Refúgio	ARR	Revis Santa Cruz	7787892,37	379908,15
Aracruz 2 - Putiri	ARP	Revis Santa Cruz	7795558,41	382269,99
Doce Sul 1 - Barra do Riacho	DSB	Reserva Indígena de Comboios	7807767,56	389346,33
Doce Sul 2 - Comboios	DSC	Reserva Indígena de Comboios	7818546,19	398483,36
Doce Sul 3 - Regência	DSR	Reserva Biológica de Comboios	7824460,93	407416,09
Doce Norte 1 - Povoação	DNP	-	7834350,26	417863,32
Doce Norte 2 – Vila de Cacimbas	DNC	ARIE do Degredo	7857980,26	426646,32

ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Doce Norte 3 - Pontal do Ipiranga	DNPI	-	7877396,26	425784,32
Doce Norte 4 - Urussuquara	DNU	-	7897769,26	423026,32
Doce Norte 5 - Guriri	DNG	-	7929528,26	421308,32

No que se refere aos manguezais, conforme descrito no Apêndice V do Plano de Trabalho (Alterações Ecológicas na Dinâmica dos Manguezais e Vegetação de Restinga sob Influência dos Sedimentos Provenientes do Rio Doce), o monitoramento ecotoxicológico foi realizado na área de influência direta do rompimento da barragem (foz do Rio Doce, estação amostral FRG), bem como nas áreas de influência consideradas atualmente como indiretas, a saber: confluência dos rios Piraquê Açú e Mirim (estação amostral PAM), manguezais de franja na área do Revis de Santa Cruz (estações amostrais RSC1 e RSC2), Rio Urussuquara (estação amostral RUR), Rio Mariricu (estação amostral RMA), Rio São Mateus (estação amostral RSM), e Rio Caravelas (estação amostral RCA). Estas informações são apresentadas com mais detalhes no Quadro 2 e na Figura 1.

Quadro 2 - Estações amostrais referentes ao monitoramento de manguezais. Coordenadas geográficas apresentadas em UTM Sirgas 2000. APA: Área de Proteção Ambiental; Revis: Refúgio de Vida Silvestre; RDS: Reserva de Desenvolvimento Sustentável.

ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Rio Piraquê-Açú	PAM	RDS Municipal Piraquê-Açú e Piraquê-Mirim	7793773,70	375807,78
RVS Santa Cruz 1	RSC1	Revis Santa Cruz	7789712,90	380046,67
RVS Santa Cruz 2	RSC2	Revis Santa Cruz	7791054,80	380874,96
Foz de Regência	FRG	-	7827888,28	413724,67
Rio Urussuquara	RUR	-	7883642,67	423977,15
Rio Mariricu	RMA	-	7904064,17	421175,81
Rio São Mateus	RSM	APA Conceição da Barra	7941617,31	421850,06

ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Rio Caravelas	RCA	APA Ponta da Baleia/Abrolhos	8037466,47	476880,37

A coleta de amostras de aves foi realizada conforme os hábitos alimentares das mesmas, nos ambientes de estuário, mangues e costeiro em três áreas amostrais: estuário do Rio Doce - Linhares (ES), manguezal na foz do Rio Piraquê-açu - Aracruz (ES), e costa adjacente à foz do Rio Doce Norte e Sul. Os pontos de coleta das aves durante as campanhas 3 (set/out 2019) e 4 (jan/fev 2020) são demonstrados nos quadros Quadro 3 e Quadro 4, respectivamente.

Todas as atividades de campo foram realizadas conforme autorização para atividades com finalidade científica emitida em 30/08/2018 pelo ICMBio/MMA (no 64261-1), com revalidação em 30/08/2019. As atividades que envolvem captura, coleta e manipulação de vertebrados possuem autorização da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da FURG (Certificado no. Pq015/2018).

Quadro 3 - Locais de coletas de aves durante a campanha 3 (set/out 2019) do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

AMBIENTE	SETOR	MUNICÍPIO/ ESTADO	LOCALIDADE	DATA	COORDENADAS (DATUM WGS 84)
Costeiro	C	Conceição da Barra, ES	APA Conceição da Barra, Praia de Guriri	30/09/2019	18°36'17.74"S, 39°44'04.25"W
				02/10/2019	18°36'18.13"S, 39°44'00.65"W
				03/10/2019	18°36'20.25"S, 39°44'00.22"W
				01/10/2019	18°36'22.64"S, 39°44'05.25"W
				02/10/2019	18°36'25.80"S, 39°43'55.67"W
				02/10/2019	18°36'26.71"S, 39°43'48.92"W
				03/10/2019	18°36'36.19"S, 39°43'45.24"W
				03/10/2019	18°36'44.62"S, 39°43'46.90"W
				01/10/2019	18°36'03.42"S, 39°44'00.02"W
				20/09/2019	19°57'01.28"S, 40°08'28.86"W
Estuário	B	Linhares, ES	Estuário da Foz Rio Doce, Distrito de Regência Augusta	18/09/2019	19°56'05.69"S, 40°07'48.38"W
				04/10/2019	18°35'59.07"S, 39°44'00.30"W
				25/09/2019	19°37'29.87"S, 39°49'06.52"W
				24/09/2019	19°37'30.77"S, 39°49'04.32"W
				25/09/2019	19°37'30.89"S, 39°49'05.14"W
				25/09/2019	19°37'49.11"S, 39°48'51.77"W
				22/09/2019	19°38'03.41"S, 39°49'27.16"W
				22/09/2019	19°38'03.56"S, 39°49'26.70"W
				24/09/2019	19°38'04.96"S, 39°49'26.6"W
				26/09/2019	19°38'10.48"S, 39°49'26.99"W
			Lagoa Areão Distrito de Regência Augusta	21/09/2019	19°35'09.38"S, 39°50'24.64"W
				21/09/2019	19°35'11.42"S, 39°50'26.25"W

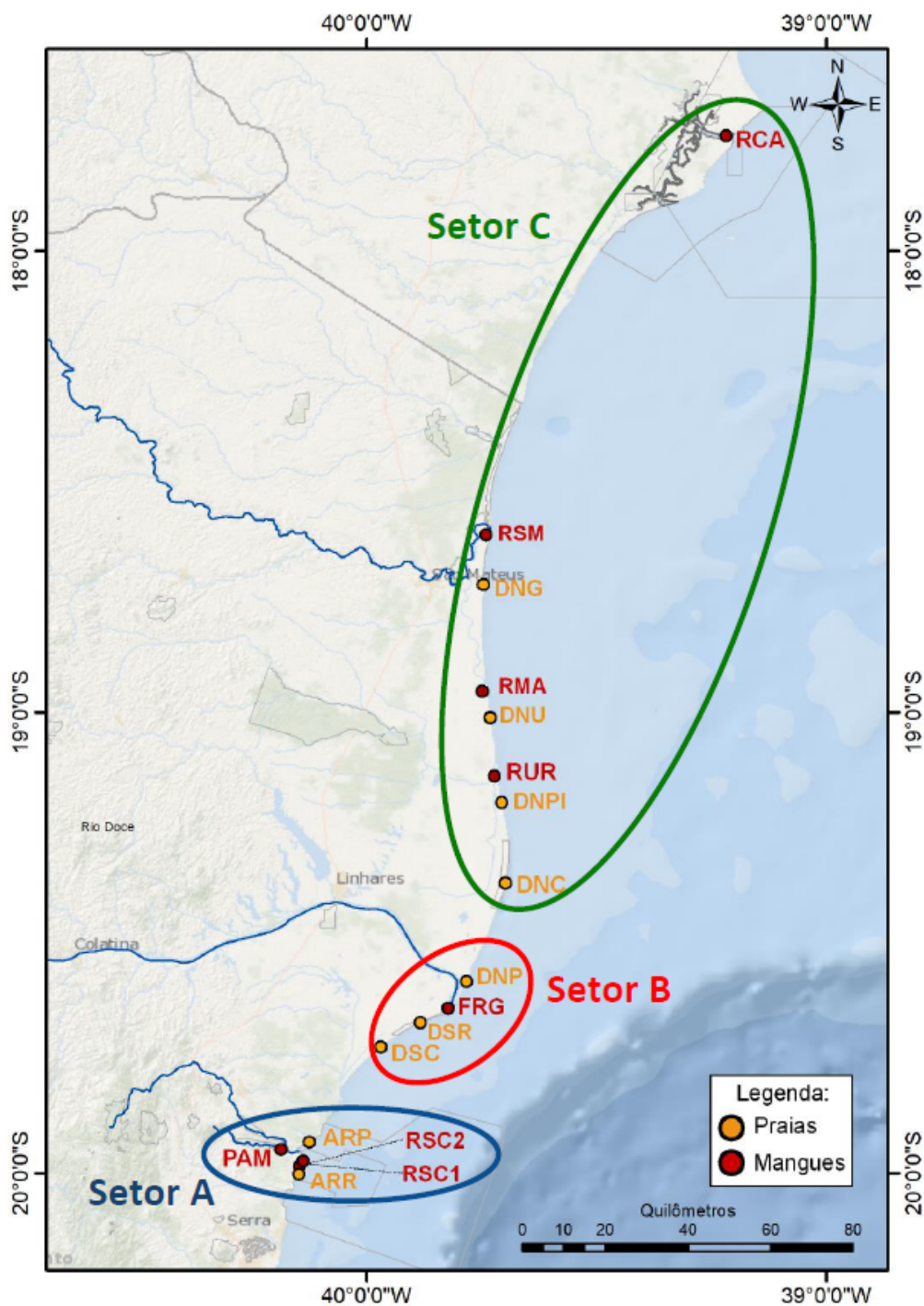
AMBIENTE	SETOR	MUNICÍPIO/ ESTADO	LOCALIDADE	DATA	COORDENADAS (DATUM WGS 84)
Mangue	A	Aracruz, ES	Pontal Piraquê-açu	20/09/2019	19°56'59.67"S, 40°09'17.11"W
				18/09/2019	19°57'00.45"S, 40°09'18.9"W
				21/09/2019	19°57'00.70"S, 40°09'24.76"W
				21/09/2019	19°57'00.89"S, 40°09'21.21"W
				21/09/2019	19°57'00.94"S, 40°09'24.03"W
				18/09/2019	19°57'01.39"S, 40°09'24.68"W
				18/09/2019	19°57'01.79"S, 40°09'29.30"W
				18/09/2019	19°57'04.09"S, 40°10'37.97"W
				20/09/2019	19°57'04.67"S, 40°09'39.64"W
				20/09/2019	19°57'12.35"S, 40°10'04.38"W
				18/09/2019	19°57'17.35"S, 40°10'18.84"W

Quadro 4 – Locais de coletas de aves durante a campanha 4 (jan/fev 2020) do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

AMBIENTE	SETOR	MUNICÍPIO/ ESTADO	LOCALIDADE	DATA	COORDENADAS (DATUM WGS 84)
Costeiro	C	Conceição da Barra, ES	APA Conceição da Barra, Praia de Guriri	30/01/2020	18°35'51.50"S, 39°44'11.26"W
				28/01/2020	18°36'08.50"S, 39°43'54.71"W
				28/01/2020	18°36'08.89"S, 39°43'57.56"W
				30/01/2020	18°36'09.83"S, 39°44'07.03"W
				30/01/2020	18°36'12.70"S, 39°44'01.48"W
				29/01/2020	18°36'17.74"S, 39°44'04.25"W
				28/01/2020	18°36'20.74"S, 39°43'43.47"W
				28/01/2020	18°36'22.64"S, 39°44'05.25"W
				29/01/2020	18°36'25.68"S, 39°43'58.76"W
				30/01/2020	18°36'29.23"S, 39°43'46.48"W
Estuário	B	Linhares, ES	Estuário da Foz Rio Doce, Distrito de Regência Augusta	24/01/2020	19°38'22.95"S, 39°48'57.38"W
			Foz do Rio Doce, Regência Augusta	02/02/2020	19°38'01.50"S; 39°48'42.5"W
			Ilha Fluvial da Foz do Rio Doce, Regência Augusta	31/01/2020	19°38'52.14"S, 39°48'48.40"W
				25/01/2020	19°36'47.58"S, 39°48'47.16"W
				24/01/2020	19°36'47.60"S, 39°48'47.56"W
				25/01/2020	19°36'55.02"S, 39°48'50.15"W
				24/01/2020	19°38'30.61"S, 39°48'53.49"W
				01/02/2020	19°38'36.31"S, 39°49'21.86"W
				01/02/2020	19°38'38.25"S; 39°49'24.92"W
			Margem do Rio Preto, Foz do Rio Doce, Regência Augusta	01/02/2020	19°38'37.64"S; 39°49'31.82"W
			Porto de Regência Augusta	05/02/2020	19°38'46.61"S; 39°49'23.57"W
Mangue	A	Aracruz, ES	Pontal Piraquê-açu	22/01/2020	19°56'25.70"S, 40°10'31.38"W
				21/01/2020	19°57'00.87"S, 40°09'23.67"W
				21/01/2020	19°57'01.00"S, 40°09'24.79"W
				22/01/2020	19°57'17.27"S, 40°10'17.96"W

				22/01/2020	19°57'17.75"S, 40°10'17.91"W
				23/01/2020	19°57'20.93"S, 40°10'10.93"W

Figura 1 - Estações amostrais referentes ao monitoramento do ambiente costeiro e respectivos agrupamentos em setores.



## 1.2 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

Como previsto no TR4, foram coletadas amostras de água nas estações amostrais de mangue e praia (Quadro 1). As coletas de água, ao longo da coluna d'água, foram realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal *Van Dorn*. Em todas as estações amostrais foram coletadas amostras de água para a análise das concentrações de metais totais e amostras de água filtrada para a análise das concentrações de metais dissolvidos. Imediatamente após a coleta, alíquotas das amostras foram acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO<sub>3</sub>, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas para a determinação das concentrações totais e dissolvidas de metais. As amostras de água foram analisadas para os seguintes elementos: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al), sendo estes dois últimos metais avaliados apenas nas amostras obtidas durante o Período de Transição (campanha 3 - set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020). Por apresentar características químicas intermediárias entre metais e não metais, o Arsênio é classicamente classificado como um elemento do grupo dos metaloides. Entretanto, este elemento apresenta um comportamento toxicológico muito semelhante aos elementos metálicos. Por esta razão, foi considerado dentro do grupo dos metais para as análises integradas.

## 1.3 ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

No momento da coleta, foram realizadas as medidas da temperatura, condutividade elétrica, salinidade, pH e oxigênio dissolvido nas amostras de água, utilizando-se uma sonda multiparâmetros (YSI Professional Plus). A concentração de sulfatos foi determinada por meio de um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Sulfato, CHEMetrics, EUA), baseado no método turbidimétrico. 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. A composição iônica (concentrações de Ca, K, Mg 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. Os parâmetros físico-químicos da água não foram apresentados no presente relatório (Relatório Anual do PMBA/Fest- RRDM, 2020), mas podem ser encontrados no bando de dados do Anexo 1 (Planilha de Dados Brutos, Anexo 1).

## 1.4 COLETA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO

Em todas as estações amostrais de mangue e praia, utilizadas para a coleta de água, foram também coletadas amostras de sedimento com auxílio de uma pá. 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. Para a análise de metais, as amostras 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, foram coletados aproximadamente 50 g de sedimento, os quais armazenados em potes plásticos e mantidos congelados até o momento das análises. As amostras de sedimento foram analisadas para os seguintes elementos: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al), sendo estes dois últimos metais avaliados apenas nas amostras obtidas durante o Período de Transição (campanha 3 - set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020).

## 1.5 COLETA DE AMOSTRAS DE BIOTA - INVERTEBRADOS

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos biológicos decorrentes da contaminação da água e sedimento por metais/As e consequente acumulação nos organismos de diferentes níveis tróficos e diferentes habitats, foram realizadas coletas de organismos típicos das regiões monitoradas.

No ambiente praial coletamos, quando possível, os seguintes organismos: poliqueto (triagem manual do sedimento; 6 indivíduos por ponto de coleta), anfípodes (triagem manual do sedimento; 5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool), o isópode *Excirolana sp.* (triagem manual do sedimento; 5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool) e o caranguejo *Ocypode quadrata* (coleta manual; 6 indivíduos por ponto de coleta). Após a biometria, os crustáceos foram adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo foi coletada e o organismo, então, dissecado para retirada de músculo, brânquias e hepatopâncreas. As amostras de hemolinfa seguiram imediatamente para a preparação de análises de biomarcadores de dano no material genético, conforme será descrito posteriormente.

Nos manguezais, apanhamos os caranguejos guaiamu (*Cardisoma guanhumi*) e lou uçá (*Ucides cordatus*). Para os manguezais de franja sobre lateritos do Revis de Santa Cruz, foram coletadas espécies de crustáceos decápodes predominantes naqueles ambientes. O número mínimo amostral ( $n \geq 5$ ) estabelecido no Anexo 5 do TR4, para as amostragens de caranguejos nos manguezais, foi aumentado para 6 indivíduos para cada espécie em cada ponto amostral. Durante a execução do monitoramento, houve a necessidade de inclusão de uma nova espécie (apenas para o ponto na foz do Rio Doce), pertencente ao mesmo nível trófico das outras, conhecida popularmente como caranguejo vermelho (*Goniopsis cruentata*) ( $n=6$ ). A inclusão desta nova espécie se deve ao fato da inexistência de *U. cordatus* no ponto referente à foz do Rio Doce. Após a biometria, os caranguejos foram adequadamente anestesiados, a hemolinfa de cada indivíduo coletada e o organismo dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. As amostras de hemolinfa, imediatamente preparadas, seguiram para as análises de biomarcadores de dano no material genético, utilizando-se pelo menos duas técnicas de avaliação, conforme será descrito posteriormente.

Todas as amostras biológicas coletadas foram acondicionadas em tubos criogênicos e congeladas em nitrogênio líquido em campo, sendo posteriormente transferidas para um ultrafreezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram acondicionadas até a análise. Nestas amostras, analisou-se os seguintes elementos:

arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al), conforme será descrito posteriormente. Cabe ressaltar que Ni e Al foram avaliados apenas nas amostras provenientes do Período de Transição (campanha 3 - set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020). As amostras biológicas também foram analisadas em termos dos biomarcadores em tecidos específicos dos organismos, considerando-se a natureza de cada biomarcador, conforme será detalhado mais adiante.

## 1.6 COLETA DE AMOSTRAS DE BIOTA - AVES

As atividades de campo para coleta das amostras de aves foram realizadas pela TEIA – Projetos Ambientais Ltda, em regiões estuarinas, de manguezais e costeiras, nos municípios de Aracruz, Linhares e São Mateus, no estado do Espírito Santo. A execução destas atividades foi realizada conforme o contrato nº 032/2018 celebrado com a Fundação de Apoio à Universidade do Rio Grande (FAURG), através do Processo Licitatório nº 462/2018 – Dispensa de Licitação, art. 24, XXI.

Realizou-se as capturas e coletas das aves nos locais amostrados, conforme Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo ICMBio/MMA (no 64261-1 e no 64261-2), com revalidação em 01/12/2019. A presente autorização contempla a coleta de no máximo 20 aves em cada uma das 3 grandes regiões amostradas. Para as amostras de penas e sangue, poderia ser coletado independentemente do método de coleta, um máximo de 60 espécimes por ano, considerados todas as localidades e estações do ano. Assim que a meta das amostras coletadas foi atingida, a amostragem foi interrompida. Além disso, as capturas e coletas das aves foram realizadas conforme o Certificado no. P036/2018 da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

A coleta das amostras foi realizada conforme os hábitos alimentares das aves relacionadas aos ambientes de estuário, manguezais e litoral, em três áreas amostrais: estuário do Rio Doce – Linhares (ES); manguezal na foz do Rio Piraquê-açu – Aracruz (ES); e praias da costa adjacente à foz do Rio Doce Norte e Sul. A representatividade das amostras seguiu os exemplos e prioridades estabelecidas no Plano de Trabalho do Anexo 1 - Ecotoxicologia. Porém, quando não se observou a ocorrência de representante de uma determinada guilda, esta foi substituída por outras guildas, desde que seus representantes possuíssem hábitos alimentares relacionados em ambientes dulcícola e estuarino, nos ambientes de estudo (estuário, manguezais e praias). Com isso, optou-se por substituir espécies de aves que contemplavam algumas guildas tróficas (i.e. filtradores e malacófagos) e que, de fato, não ocorreram em certas áreas amostradas, por outras espécies com representatividade em seus hábitos alimentares, tais como: onívoros, consumidores de invertebrados, pequenos vertebrados e frutos [exemplos: Cuculidae (*Crotophaga major*), Tyrannidae (*Pitangus sulphuratus*); Mimidae (*Mimus gilvus*); Thraupidae (*Conirostrum bicolor*); e Icteridae (*Icterus jamacaii*)] e insetívoros, consumidores de insetos aquáticos e terrestres [exemplos: Dendrocolaptidae (*Dendroplex picus*); Tyrannidae (*Fluvicola nengeta*); Furnariidae (*Furnarius figulus* e *Certhiaxis cinnamomeus*); Hirundinidae (*Tachycinetta albiventer* e *Stelgidopteryx ruficollis*); e Caprimulgidae (*Nannochordeiles pusillus*)]. As espécies aqui

citadas possuem associação com ambientes de mangue, restinga, corpos d'água e/ou podem estar presentes em ambientes dulcícola e estuarino (Sick, 1996; Sigrist, 2006).

A captura das aves foi realizada com o uso de redes com malha de 20 mm ou 35 mm, medindo 6, 9, 12 ou 18 m de comprimento por 3 m de altura. Estas redes foram instaladas nos diferentes ambientes das áreas pré-definidas, com auxílio de hastes de alumínio e cordas. A quantidade de redes utilizadas variou conforme as condições ambientais dos locais de coleta, tendo sido utilizadas no máximo dez redes. O esforço de captura se deu pelo menos ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados. As aves capturadas foram acondicionadas em sacos de tecido específicos para contenção destes animais e levadas até a base de apoio, localizada próxima das redes, onde manipulou-se e identificou-se das aves, bem como a coleta de dados e amostras e posterior liberação da ave. Apesar do no TR4 estarem previstas apenas rederes de 10 e 12 m, houve a necessidade de utilização de redes com outras metragens (especificadas acima), por conta das características e condições ambientais encontradas em cada área amostral (mangue, estuário e costeira). No caso dos ambientes de mangue e estuário quando possível foram utilizadas as redes de maior comprimento, porém em outras situações era impraticável e se optou pela utilização de mais redes de menor comprimento para contornar obstáculos e ou abranger curtas dimensões como, por exemplo, corpos d'água e situações pontuais para captura de determinadas espécies. No ambiente costeiro pela condição mais ampla da paisagem e suas características ambientais foram predominantemente utilizadas as redes de 12 m ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados. Apesar da utilização de redes de menor comprimento a quantidade utilizada foi proporcional as redes de maior comprimento, que também foram utilizadas, com isso atendemos aos esforços e os objetivos por este método.

Nas aves capturadas vivas, foram coletadas as seguintes amostras: sangue (máximo de 1% da massa corporal da ave; coleta em microtubo ou frasco de 1,5 ml, sem anticoagulante); penas de contorno e penas em crescimento (mínimo de 5 a 10 penas, para ambos os tipos de penas). A coleta de sangue das aves vivas foi realizada após a limpeza do local com álcool gel 70%, bem como a avaliação da condição física e do estado de estresse da ave. Visando reduzir o nível de estresse, optou-se pela colheita do sangue com agulha de insulina, através de punção da veia ulnar ou pelo corte de uma das unhas, no caso de espécimes de menor massa corporal. A quantidade de sangue coletado foi de no máximo 0,2 ml nas aves menores e de 2 ml nas aves com massa corporal superior a 500 g. Após a colheita de sangue, o frasco contendo a amostra foi mantido refrigerado, até ser congelado. A retirada das penas de crescimento e de contorno foi concretizada manualmente com o auxílio de uma pinça. As amostras de penas foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas, até serem congeladas. Esta forma de armazenamento se deu para garantir a integridade das penas coletadas até que as análises químicas fossem realizadas.

As coletas foram realizadas através do recolhimento de aves encontradas mortas nas áreas amostradas e com os usos de carabinas de ar comprimido (Gamo CFX 4,5; Gamo Black Maxxim 5,5; e pistola Beemam 4,5). Os esforços de coletas foram complementares e direcionados às espécies não capturadas nas redes de neblinas. Cada ave coletada individualmente e acondicionada em saco plástico e, tão logo possível, foi mantida refrigerada em caixa térmica com gelo ou congelada, até ser

preparada em laboratório, onde efetivou-se a coleta das seguintes amostras: sangue coagulado, tecidos do músculo peitoral, parte do fígado e um osso (fêmur). Após isso, identificou-se o sexo da ave, através da visualização das gônadas, bem como a retirada do trato digestório para separação do conteúdo estomacal, completando assim a coleta das amostras das aves mortas. Em seguida, efetivou-se a taxidermia dos espécimes. As aves taxidermizadas foram provisoriamente acondicionadas em sacos plásticos lacrados e, posteriormente, acondicionadas a seco em caixa de isopor, até o transporte para o Instituto de Ciências Biológicas da FURG, em Rio Grande/RS.

Para todas as aves amostradas foram feitas anotações de morfometria, muda das penas, idade, sexo, peso da ave e, quando presente, coletou-se ectoparasitas e endoparasitas. Para as aves coletadas, adicionalmente, anotou-se o peso total do conteúdo estomacal, coletada a carcaça da ave após a coleta das amostras e realizada a taxidermia da pele do indivíduo, visando o aproveitamento científico e tombamento na Coleção de Aves da FURG (CAFURG). As amostras, exceto as peles taxidermizadas, foram mantidas congeladas. Após o encerramento da campanha, transportou-se as amostras e peles taxidermizadas, via terrestre até o Instituto de Ciências Biológicas da FURG, em Rio Grande, RS.

## 1.7 ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS E ARSÊNIO 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, invertebrados (indivíduos inteiros ou tecidos), e aves (tecidos) 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).

Para o caso das amostras de água, estas foram previamente foram dessalinizadas, a fim de minimizar um possível "efeito matriz" associado às altas concentrações de íons presentes na água salgada (Nadella et al., 2009). 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 de preparo e análise das amostras foram igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, utilizou-se as soluções-padrão certificadas pelo 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, as análises 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 e lavá-lo, para eliminar interferentes salinos, com água ultrapura. 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 ficasse 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, foi submetida 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 HNO<sub>3</sub> 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 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, o que alterou entre as metodologias aplicadas no Ano 1 e no Período de Transição foi o procedimento de preparo da amostra.

As amostras de material biológico foram 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 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 incubadora (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 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM AVES

A análise de compostos orgânicos (Quadro 1 A1CS2) foram realizadas no sangue das aves coletadas. Para a determinação de organoclorados, foram realizadas extrações de material biológico seco em *sohxlet* utilizando-se mistura hexano e diclorometano (1:1; v/v). Os padrões internos de PCB 103 e PCB 198 foram adicionados às amostras, que tiveram seu volume final reduzido para posterior purificação com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O conteúdo lipídico das amostras foi quantificado por gravimetria e as concentrações finais dos compostos organoclorados foram normalizadas a partir deste. As concentrações foram quantificadas em cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de

elétrons (GC/ECD). O controle de qualidade foi feito por análises de “brancos” e de injeção randômica de padrões certificados de referência.

A análise de compostos organobromados se deu a partir de extrações em *sohxlet* idênticas às realizadas para os compostos organoclorados. Os padrões internos PBDE-181 e PBDE-209 foram adicionados às amostras e o volume final foi reduzido para a posterior purificação. O conteúdo lipídico foi quantificado por gravimetria e as concentrações finais dos organobromados foram normalizadas a partir deste. As concentrações dos PBDEs e MeO-PBDEs foram quantificadas em cromatógrafo de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa (GC/MS). O controle de qualidade foi feito por análises de “brancos” e de injeção randômica de padrões certificados de referência.

Alíquotas das amostras biológicas foram tratadas para análise de HPAs através da liofilização, pesagem e extração em *sohxlet* com metanol, com posterior saponificação por adição de hidróxido de potássio. Posteriormente, a amostra foi transferida para um funil de separação, onde é adicionado hexano. O extrato de hexano é então separado, por agitação manual, e recolhido em novo balão volumétrico. O procedimento é repetido três vezes, recolhendo-se todo extrato de hexano e reduzido-o a cerca de 1mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos são, então, purificados por *clean up* em colunas de vidro. Em seguida, adiciona-se ao extrato reduzido o padrão interno em Turbo vap, para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs se deu por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC/MS).

## 1.9 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 invertebrados, considerando-se os potenciais efeitos biológicos dos metais/As (desequilíbrio iônico e osmótico, inibição enzimática, oxidação de biomoléculas, e danos morfológicos) nos respectivos tecidos e organismos analisados. As metodologias empregadas para as análises dos biomarcadores no ambiente costeiro estão listadas no Quadro 5 e encontram-se descritas abaixo. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises e de precisão e reprodutibilidade dos dados, sempre que possível, foram utilizados kits comerciais de reagentes específicos que utilizam metodologia semelhante àquelas descritas abaixo, para a determinação dos respectivos biomarcadores.

Quadro 5 - Lista dos biomarcadores analisados em amostras de organismos coletados pelo Anexo 1 no ambiente costeiro.

AMOSTRA	BIOMARCADOR (classificação: efeito/exposição)
---------	---

Pools de: Poliquetos,anfípodes e isópodes	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Hemolinfa de caranguejos	Danos de DNA (efeito)
Brânquias de caranguejos	Peroxidação lipídica (efeito)
Hepatopâncreas de caranguejos	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)

### 1.9.1 Concentração de metalotioneínas (MT)

A determinação da concentração de metalotioneínas 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 de MT seguiram aqueles descritos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em µg MT/mg proteína.

### 1.9.2 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada nas amostras do 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 (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) foi medida utilizando-se um espectrofluorímetro. Calculamos os dados 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.

### 1.9.3 Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram determinados de acordo com o 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 isto, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) e o fluoróforo livre removido após a lavagem do precipitado proteico com acetona. Após a solubilização do precipitado proteico em hidrocloreto 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.

#### 1.9.4 Danos de DNA

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 (DNA isolation kit, fornecido pela PromoKine, Promocell©). 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/10<sup>5</sup> pares de bases (bp).

## 1.10 REFERÊNCIAS

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.

SICK, H. 1997. **Ornitologia Brasileira.** Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, II 862p.

SIGRIST, T. 2006. **Aves Brasileiras: uma visão artística.** Valinos, Editora Avis Brasilis, 672p.

USEPA, 1996. **Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.** "Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils". Disponível em: <https://www.epa.gov/esam/epa-method-3050b-acid-digestion-sediments-sludges-and-soils>.

WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M., PEAKALL, D.B. 1996. **Principles of ecotoxicology.** London, Taylor & Francis. 321p.