

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da  
Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região  
Marinha e Costeira Adjacente**

**Material Suplementar Ambiente Dulcícola – Tema Ecotoxicologia**

**RT- 43/ JUN 23**

**RA2022 PMBA/Fest**

Vitória,

Junho de 2023

## SUMÁRIO

<b>1. HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL .....</b>	<b>3</b>
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>3</b>
2.1 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA, SEDIMENTO E BIOTA.....	3
2.2 ANÁLISES DE LABORATÓRIO .....	13
2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	22
<b>3. RESULTADOS DOS INDICADORES .....</b>	<b>22</b>
3.1 ÍNDICE DE BIOACUMULAÇÃO ( <i>IBR BIOACUMULAÇÃO</i> ) .....	23
3.2 ÍNDICE DE RESPOSTA BIOLÓGICA ( <i>IBR BIOMARCADOR</i> ) .....	32
3.3 DIVERSIDADE MICROBIANA .....	43
3.4 ÍNDICE DE TOXICIDADE .....	49
<b>4 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

## 1. HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

O histórico de malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) abrange informações de suma importância para o balizamento do presente programa, uma vez que passou por modificações ao longo do tempo, visando melhor atender aos objetivos do PMBA/Fest. Todas as modificações foram aprovadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) por meio do ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019, para o período de transição.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) MS - Malha e frequência amostrais, onde as diferentes malhas e frequências amostrais são apresentadas nas abas “Ano 1”, “Transição” e “Histórico Frequências” e 2) MS – Mapas das malhas amostrais, com a espacialização referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais coletadas entre setembro de 2018 e setembro de 2019 e “Transição” às estações entre outubro de 2019 e setembro de 2022.

Cabe destacar que o tema Ecotoxicologia, diferentemente dos demais temas componentes do PMBA/Fest, apenas teve sua Proposta Técnica de continuidade do monitoramento, denominada “Novo Ciclo” aprovada e implementada em janeiro de 2023. Deste modo, as modificações realizadas de malha e frequência amostral não são consideradas neste documento, que tem abrangência temporal de amostragem de setembro de 2018 a setembro de 2022.

## 2. METODOLOGIA

A metodologia apresentada contempla o escopo em vigência no momento de entrega deste relatório, ou seja, as amostragens e análises previstas para o Novo Ciclo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática – PMBA submetidas à Fundação Renova através do FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE PLANO DE TRABALHO em 31 de agosto de 2022. Após a descrição da metodologia implementada, será apresentado um breve descritivo sobre as modificações metodológicas (parâmetros, análise de parâmetros ou grupo de parâmetros, dentre outros) que ocorreram ao longo da evolução do PMBA/Fest a fim de determinar os indicadores.

### 2.1 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA, SEDIMENTO E BIOTA

Os protocolos de coleta e análise das amostras ambientais e biológicas foram aqueles já descritos anteriormente no âmbito do PMBA (RRDM, RSE 2022), considerando-se, no entanto, as recomendações do *“Parecer técnico dos métodos adotados para quantificação de metais e arsênio em tecidos e vísceras da biota aquática - Avaliação da adequação e eficiência metodológica das análises de metais e arsênio no âmbito do PMBA”* emitido pela Fundação Renova em agosto de 2022. Neste caso, foram sugeridas alterações, adotadas a partir da Campanha 8 (set/out 2022), na coleta das amostras de água, sedimento e biota destinadas às análises de arsênio e metais, conforme segue:

- (1) os frascos destinados às coletas, mesmo que ainda não tenham sido utilizados, foram banhados em ácido nítrico 5%, por 24 horas, completados por lavagem em água deionizada em abundância, para se evitar qualquer fonte de contaminação.
- (2) 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) para a análise das concentrações de metais totais e 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo) de água filtrada (filtro de 0,45 µm de malha) para a análise das concentrações de metais na fração dissolvida. O volume de amostra de água coletado por réplica, que era de 100 mL, passou a ser de 250 mL. Sendo assim, foi adicionado em cada réplica acidificada um volume de 3,5 mL de ácido nítrico Suprapur 65%. As amostras de água acidificadas foram mantidas refrigeradas e as alíquotas do ambiente dulcícola, com a especificação de congelamento, foram mantidas congeladas. Adicionalmente, amostras de água foram coletadas para frascos de diferentes volumes e imediatamente congeladas para uso nos testes de toxicidade.
- (3) As coletas de amostras de sedimento destinadas às análises químicas seguiram a metodologia padrão empregada desde a Campanha 1 (set/out 2018). 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. A partir da Campanha 8 (set/out 2022), a massa de sedimento coletada por réplica, que era de 50 g, passou a ser de, no mínimo, 200 g. Potes com capacidade total de 250 g foram preenchidos, deixando-se apenas o espaço de expansão do congelamento, para garantir a massa necessária de amostra para as determinações. As amostras de sedimentos foram mantidas congeladas. Adicionalmente, amostras de sedimento foram coletadas para frascos de diferentes volumes e mantidas refrigeradas para uso nos testes de toxicidade.
- (4) A quantidade da massa de tecido muscular coletada por organismo foi aumentada, incrementando assim a representatividade da amostra e possibilitando, minimamente, a análise em duplicatas, para verificação de variações e precisão nos resultados e a robustez nas análises. Foi garantida massa úmida de 0,25 g em cada amostra de músculo de pescado. Organismos pequenos, como por exemplo camarões de água doce, foram amostrados em pools. As amostras de músculo de pescado destinadas à quantificação de elementos-traço foram acondicionadas em sacos zip e mantidas congeladas, com a identificação em papel vegetal, facilitando assim a secagem e posterior armazenamento dessas amostras.

As determinações dos elementos Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg) e Zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al) nas amostras de

água e sedimento referentes à Campanha 7 (março 2022 – período chuvoso) ainda se encontram em fase de discussão e definição por parte da Fundação Renova. Por sua vez, as determinações destes elementos nas amostras de água e sedimento referentes à Campanha 8 (set/out 2022 – período seco) serão encaminhadas para análise em laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova.

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 multiparâmetro (YSI Professional Plus). As determinações das concentrações de carbono orgânico e sulfatos, bem como da alcalinidade total e composição iônica (concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ ) nas amostras coletadas na Campanha 7 ainda estão em discussão e definição por parte da Fundação Renova. Por sua vez, as análises das amostras coletadas na Campanha 8 serão enviadas para análise em laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova.

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

No ambiente de água doce, foram coletadas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de quironomídeos, 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*, e outras). No ambiente estuarino (calha do Rio Doce próximo à sua foz), foram coletadas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, camarão e quatro espécies de peixes (espécies originalmente previstas: carapicu *Eucinostomus sp.*, corvina *Pachyurus adspersus*, bicudo *Pomadasys ramosus* e bagre caçari *Genidens genides*, e outras). Na ausência de espécies originalmente previstas, foram coletadas outras espécies de peixes que ocupassem o mesmo habitat e o mesmo nicho trófico. A lista de espécies coletadas durante a Campanha 7 (mar/2022 – período chuvoso) está descrita na Tabela 1, enquanto as espécies coletadas durante a Campanha 8 (set/out 2022 – período seco) encontram-se listadas na Tabela 2.

Tabela 1: Espécies de peixes (nome científico e/ou nome popular e número de indivíduos) coletados no Rio Doce e região estuarina, afluente, lagoas e lagoas adjacentes durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar/ 2022).

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
LAL-01		11	12	23
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	6		6
	Peixe alternativo 3 - <i>Astyanax lacustris</i>		1	1
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	5		5
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum littorale</i>		2	2
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		3	3
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	6
LJP-01		12	12	24
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		6	6

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
LLM-01	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus</i> sp.	6		6
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla</i> sp.	6		6
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		2	2
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Astronotus ocellatus</i>		4	4
LLM-01		13	12	25
LMN-01	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias</i> sp.	3		3
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus</i> sp.		2	2
	Peixe alternativo 3 - <i>Astyanax lacustris</i>		2	2
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		4	4
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus</i> sp.	6		6
	Peixe alternativo 7 - <i>Tracheolypterus striatulus</i>		2	2
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla</i> sp.	3		3
	Peixe alvo 3 - <i>Pimelodus maculatus</i>		2	2
	Peixe dulcícola alternativo - Corvina	1		1
LMN-01		16	5	21
LNV-01	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias</i> sp.	5		5
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus</i> sp.		5	5
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Crenicichla</i> sp.	1		1
	Peixe dulcícola alternativo - Dourado	1		1
	Peixe dulcícola alternativo - Marabá	2		2
	Peixe estuarino 1 - <i>Genidens</i> spp.	6		6
	Peixe estuarino alternativo 5 - <i>Caranx crysos</i> (xaréu)	1		1
LNV-01		10	12	22
LPA-01	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias</i> sp.	3		3
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus</i> sp.		2	2
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		4	4
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus</i> sp.	6		6
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla</i> sp.	1		1
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	6
LPA-01		12	12	24
RDO-11	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus</i> sp.	6		6
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum littorale</i>		6	6
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla</i> sp.	6		6
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	6
RDO-11		12	12	24
RDO-13	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias</i> sp.	1		1
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		6	6
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus</i> sp.	6		6
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla</i> sp.	5		5
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		6	6
RDO-13		9	12	21
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias</i> sp.	1		1

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		2	2
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	6		6
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		1	1
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	2		2
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		3	3
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	6
RDO-15		3	12	15
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus sp.</i>		1	1
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		3	3
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	2		2
	Peixe alternativo 7 - <i>Tracheolypterus striatulus</i>		1	1
	Peixe alvo 3 - <i>Pimelodus maculatus</i>		3	3
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		2	2
	Peixe dulcícola alternativo - Dourado	1		1
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Leporinus sp.</i> (piauí)		2	2
RDO-16		11	12	23
	Peixe alternativo 3 - <i>Astyanax lacustris</i>		2	2
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	5		5
	Peixe alternativo 7 - <i>Tracheolypterus striatulus</i>		6	6
	Peixe alvo 3 - <i>Pimelodus maculatus</i>		1	1
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		3	3
	Peixe estuarino 1 - <i>Genidens spp.</i>	6		6
RGU-01		1	4	5
	Peixe alternativo 7 - <i>Tracheolypterus striatulus</i>		2	2
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		2	2
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Gymnotus spp.</i> (Sarapô)	1		1
Total		110	117	227

Tabela 2: Espécies de peixes (nome científico e/ou nome popular número de indivíduos) coletados no Rio Doce e região estuarina, afluente, lagoas e lagoas adjacentes durante a Campanha 8 (período seco, set/out 2022).

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
LAL-01				26
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	7		
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	5		
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		6	
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		5	
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		1	

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
LJP-01	Peixe dulcícola alternativo - Marabá	2		
				24
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	5		
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus sp.</i>		1	
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		4	
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	6		
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		6	
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	1		
LLM-01	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		1	
				24
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	5		
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus sp.</i>		6	
	Peixe alternativo 3 - <i>Astyanax lacustris</i>		1	
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		5	
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	6		
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Crenicichla spp.</i> (joaninha)	1		
LMN-01				21
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	1		
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	2		
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		6	
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Crenicichla spp.</i> (joaninha)	1		
	Peixe dulcícola alternativo - Marabá	2		
	Peixe estuarino 1 - <i>Genidens spp.</i>	2		
LNV-01	Peixe estuarino alternativo 1 - <i>Centropomus sp.</i>	1		
				25
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	5		
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	6		
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		6	
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	1		
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Oligosarcus acutirostris</i>	1		



Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
LPA-01				23
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	5		
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		6	
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	3		
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	3		
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		6	
RDO-11				19
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		6	
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	2		
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	1		
	Peixe alvo 3 - <i>Pimelodus maculatus</i>		3	
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Oligosarcus acutirostris</i>	7		
RDO-13				11
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus sp.</i>		2	
	Peixe alternativo 4 - <i>Metynnis maculatus</i>		1	
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		1	
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	2		
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		1	
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		3	
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Leporinus sp.</i> (piauí)		1	
RDO-15				16
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	1		
	Peixe alternativo 3 - <i>Astyanax spp.</i>		6	
	Peixe alternativo 5 - <i>Pygocentrus sp.</i>	3		
	Peixe alternativo 6 - <i>Hoplosternum litoralle</i>		3	
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	1		
	Peixe alvo 3 - <i>Pimelodus maculatus</i>		2	
RDO-16				24
	Peixe alternativo 1 - <i>Hoplias sp.</i>	4		
	Peixe alvo 1 - <i>Cichla sp.</i>	1		
	Peixe alvo 3 - <i>Pimelodus maculatus</i>		5	
	Peixe alvo 4 - <i>Prochilodus lineatus</i>		3	

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
	Peixe dulcícola alternativo - <i>Astronotus ocellatus</i> (oscar)		2	
	Peixe estuarino 1 - <i>Genidens spp.</i>	6		
	Peixe estuarino 4 - Corvina Rio	1		
	Peixe estuarino alternativo 1 - <i>Centropomus sp.</i>	1		
	Peixe estuarino alternativo 8 - <i>Mugil sp.</i> (tainha)		1	
RGU-01				9
	Peixe alternativo 2 - <i>Geophagus sp.</i>		1	
	Peixe alternativo 3 - <i>Astyanax spp.</i>		2	
	Peixe alternativo 7 - <i>Tracheolypterus striatulus</i>		2	
	Peixe alvo 2 - <i>Hypostomus affinis</i>		2	
	Peixe estuarino 1 - <i>Genidens spp.</i>		2	
Total				222

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

No caso dos camarões, a coleta foi realizada com utilização de diversos petrechos de pesca, conforme o ambiente (por exemplo: redes de cerco, redes de arrasto e covos). 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. A sequência dos procedimentos realizados encontra-se descrita 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 na hemolinfa de camarões, 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 [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>]; 94 mM Citrato de Sódio [Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O]; 26 mM Ácido Cítrico [C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>]; 7,85 mM EDTA dissódico [C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O]; 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, 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (n = 6). O tecido branquial destinado à atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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 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 da concentração de proteínas carboniladas (n = 6). Para análise das concentrações de As e metais no tecido muscular, as amostras foram coletadas conforme descrito anteriormente. Durante a coleta, foram retirados o cordão nervoso ventral e o intestino do animal, antes de congelar o músculo.

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 100 m de comprimento. Em cada ponto de amostragem, ao final da tarde, foram armados três conjuntos de redes com unidades de todas as malhas, 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 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 puxada 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 os tecidos/órgãos alvo coletados, 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 sangue foi centrifugada e o plasma foi separado para análise da composição iônica sanguínea. Outra alíquota de 15 µL de 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, com auxílio de pinça e tesoura, evitando-se ao máximo tocar os filamentos branquiais. 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. A coleta de amostras de músculo para análise das concentrações de As e metais seguiram as recomendações descritas anteriormente. Após a dissecação dos animais em campo, a carcaça foi descartada no local de coleta (campo).

## 2.2 ANÁLISES DE LABORATÓRIO

### *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 e sedimento deu-se através da extração do DNA total, utilizando-se o *PowerSoil DNA isolation kit* (MoBio), e posterior sequenciamento de DNA, utilizando-se sequenciadores de nova geração. As leituras foram geradas e processadas utilizando-se 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 amostrais e nos diferentes períodos, correlacionando-se 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.

### *Análises das concentrações de metais e arsênio na biota*

As análises das concentrações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Na, Mn, Ni, Pb e Zn nas amostras biológicas coletadas na Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso) foram realizadas de acordo com metodologia EPA 6020A, utilizando-se espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Analytic Jena). Contudo, as determinações de As e metais nas amostras de músculo de pescado (camarões e peixes) coletadas na Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso) ainda aguardam uma definição por parte da Fundação Renova. Por sua vez, as amostras de músculo de pescado (camarões e peixes) coletadas na Campanha 8 (set/out 2022) serão enviadas para análise de As e metais em laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova. Por fim, a análise das demais amostras biológicas coletadas na Campanha 8 (set/out 2022) também ainda aguardam a definição por parte da Fundação Renova.

Resumidamente, as amostras de material biológico coletadas na Campanha 7 (exceto músculo de pescado) foram previamente secas em estufa (45-60°C) até peso constante e o teor de umidade foi obtido. A digestão foi realizada em um sistema de digestão por micro-ondas modelo Multiwave 3000®

(Anton-Paar), equipado com um rotor para oito recipientes de quartzo do tipo 80 mL (operando na pressão de 80 bar), utilizando-se ácido nítrico ultrapuro (Suprapur, Merck). Todas as amostras foram diluídas a um fator de 10 vezes utilizando-se água ultrapura (18 MΩ cm), visando adequar as concentrações dos metais e arsênio às aquelas das soluções padrão certificadas, utilizadas para calibrar os equipamentos. As concentrações dos metais e arsênio no material biológico foram expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido). O controle de qualidade foi realizado através de brancos analíticos e ensaios de recuperação com materiais de referência certificados.

#### *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 1 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 às aquelas descritas abaixo, para a determinação dos respectivos biomarcadores.

Quadro 1: Lista dos biomarcadores analisados nas amostras de organismos coletados nas diferentes áreas do monitoramento dulcícola.

<b>Amostra biológica</b>	<b>Biomarcador (classificação: exposição/efeito)</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)
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)



Amostra biológica	Biomarcador (classificação: exposição/efeito)
	Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Músculo de camarões e peixes	Oxidação de proteínas (efeito)

A determinação da concentração de metalotioneínas (MT) foi realizada por meio de um *kit* comercial de reagentes (*Fish Metallothionein ELISA Kit*, 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.

Para a avaliação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$  (NKA), preparou-se as amostras de material biológico 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  $\mu\text{L}$  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  $\text{MgCl}_2$  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 à 25°C no escuro. A mesma reação foi realizada com 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina “B” contendo 83 mM de NaCl, 6 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 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 foi 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.

Para a determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados coletados 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, hemolinfa dos camarões e 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 de acordo com metodologia EPA 6020A, utilizando-se espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Analytic Jena, Alemanha. 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.

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 Lática LDH UV® (Bioclin). Para a determinação da atividade da MDH foram adicionados aos sobrenadantes dos homogeneizados uma solução contendo ácido oxaloacético (0,4 mM), MgCl<sub>2</sub> (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 foi realizada através do método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Enzimáticas/mg de proteína.

A atividade da CAT foi determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), conforme descrito por Aebi (1984). Por sua vez, a atividade da SOD foi medida através da taxa de inibição da auto-oxidação do pirogalol, de acordo com o protocolo de Marklund e Marklund (1974). A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados foi realizada através do método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Enzimáticas/mg de proteína.

A lipoperoxidação (LPO) foi determinada no material biológico utilizando-se um método espectrofotométrico em microplaca, seguindo as recomendações do *kit* comercial *TBARS Assay Kit*, (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. Assim, os resultados foram expressos em nmol MDA/mg proteína.

Os danos oxidativos em proteínas foram determinados de acordo com um *kit* comercial de reagentes (*OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay*, 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 isso, 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 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.

Inicialmente havia sido estipulada 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*, Promega Corporation). A análise de sítios AP propriamente dita 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*, Promokine, Promocell©; ou outro *kit* similar). Os resultados foram expressos em sítios AP/10<sup>5</sup> 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. Tais amostras foram coletadas com seringas (1 mL) munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos às células, e transferidas para tubos, os quais foram centrifugados em microcentrífuga (1.000 rpm, por 5 min). Após isso, foram colhidos 50 µL do precipitado de células, com auxílio de uma 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 para cada indivíduo coletado, 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 (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 foram lavadas com água deionizada, secas ao ar e montadas com lamínulas e Entellan® (Merck). Posteriormente, as lâminas foram examinadas 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 1.000 células em cada lâmina, sendo, então, quantificado o número de células micronucleadas por 1.000 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 nos distintos ambientes monitorados.

Efeitos histopatológicos foram avaliados nas amostras de brânquias e fígado dos peixes. Fragmentos de fígado e brânquias foram imersos em solução de Bouin por 6 - 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 tal, foram banhadas em ácido periódico 1% por 10 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff, por 20 min. Em seguida, foi 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. 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 ( $Irp = \sum alt (a \times w)$ , onde rp = padrão de reação, alt = alteração, a = extensão da lesão e w = grau de importância).

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), cujo princípio de análise utiliza o método espectrofotométrico *ELISA* em microplaca.

#### *Ensaios ecotoxicológicos*

Ensaios ecotoxicológicos foram realizados para classificar amostras de água e sedimento, coletadas na porção capixaba do Rio Doce, quanto às suas toxicidades. Os pontos de amostragem considerados 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, RDO-11 e RDO-13 foram incluídos na malha amostral para ensaios de toxicidade a partir do Ano 2, mediante aprovação da CTBio (Nota Técnica no 8/2019/CTBio/DIBIO/ICMBio [22/03/2019]) (Quadro 2). A avaliação toxicológica das amostras de água, elutriato de sedimento e sedimento total, as quais foram 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 3). Para o cálculo do índice de toxicidade, levou-se em consideração a severidade da resposta observada (Quadro 3) e sensibilidade do organismo testado (Quadro 4). 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 até altamente tóxicas (Tabela 4).

Vale lembrar que, para cada ponto amostral, esta classificação foi feita separadamente para água e sedimento, e levou-se 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 as amostras coletadas no Ano 1, Ano 2 e Ano 3 nos ambientes dulcícola e marinho.

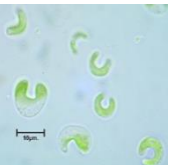





Com relação aos ensaios nas amostras coletadas na Campanha 7 (mar 2021) e Campanha 8 (jul/ago 2022), cabe destacar que, por determinação da Fundação Renova, os testes agudos e crônicos com os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* (ABNT NBR 13373), *Daphnia similis* (agudo - ABNT NBR

12713 e crônico – OECD 211) e *Hyalella* sp (ABNT NBR 15470), e peixes da espécie *Danio rerio* nos estágios larval (ABNT NBR 15499) e adultos (ABNT NBR 15088) foram realizados por laboratório acreditado (Aplysia). Os ensaios realizados com a microalga *Raphidoceles subcapitata* (ABNT NBR 12648) foram realizados no laboratório de microalgas do Instituto de Ciências Biológicas da FURG, sob responsabilidade da Equipe de Ecotoxicologia. Vale lembrar que, nas campanhas anteriores, todos os ensaios foram realizados na FURG. É importante ressaltar que no Período de Transição (set/out 2019 e jan/fev 2020) não foram realizados ensaios com embriões do peixe *D. rerio* (FET TEST, OECD 236), com anuência prévia da CTBio, em função dos resultados obtidos para o Ano 1 terem sido inconclusivos (Nota Técnica no 8/2019/CTBio/DIBIO/ICMBio [22/03/2019]). Além disso, foi incorporado o ensaio crônico com o microcrustáceo *C. dubia*, em substituição ao ensaio crônico com o microcrustáceo *D. magna* (ambos os ensaios foram propostos no Plano de Trabalho). Os ensaios são equivalentes do ponto de vista ecotoxicológico, sendo que o ensaio com *C. dubia* apresenta 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 os casos se considera a reprodução (número de neonatos) dos cladóceros representativos do zooplâncton (Tabela 3).

Quadro 2: 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, período chuvoso – set/out 2018 e Campanha 2, período chuvoso – jan/fev 2019), Ano 2 (Campanha 3, período chuvoso – set/out 2019 e Campanha 4, período chuvoso – jan/fev 2020) e Ano 3 (Campanha 5, período chuvoso - jan/fev 2021 e Campanha 6, período seco - jul/ago 2021).

AMBIENTE	ANO 1	Ano 2 até o presente
Dulcícola	RGU-01  RDO-16	RGU-01
		RDO-11
		RDO-13
		RDO-16

Tabela 3: Resumo dos ensaios de toxicidade realizados com amostras de água e sedimento (bruto ou elutriato) coletados na malha amostral dulcícola do Tema Ecotoxicologia (ver Quadro 3).

Informação	Microalga	Microcrustáceo	Microcrustáceo	Microcrustáceo	Peixe	Peixe
Espécie	 <i>Raphidocelis subcapitata</i> <sup>1</sup>	 <i>Ceriodaphnia dubia</i> <sup>2</sup>	 <i>Daphnia similis</i> <sup>3</sup>	 <i>Hyalella spp</i> <sup>3</sup>	 <i>Danio rerio</i> (larva) <sup>3</sup>	 <i>Danio rerio</i> (adulto) <sup>4</sup>
Procedência do organismo	Coleção de Cultivo de Microalgas Dulciaquícolas (CCMD) – CH012 – ICB/FURG	Cultivo da Empresa Aplysia	Cultivo da Empresa Aplysia	Cultivo da Empresa Aplysia	Cultivo da Empresa Aplysia	Cultivo da Empresa Aplysia
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	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
Indicador de toxicidade	Inibição da multiplicação das algáceas	Mortalidade/Número de neonatos viáveis	Mortalidade/Número de neonatos viáveis	Mortalidade/Peso	Mortalidade	Mortalidade

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

Quadro 3: 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 4: 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 4: 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.

## 2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS

As principais modificações metodológicas envolveram a otimização no volume/massa das amostras coletadas, de água, sedimento e biota destinadas as determinações de As e metais, a partir da Campanha 8 (mar 2022), aumentando assim a representatividade da amostra e possibilitando, minimamente, a análise em duplicatas, para verificação de variações e precisão nos resultados. Estas modificações encontram-se descritas na seção anterior. A partir da Campanha 6 (jul/ago 2021), as análises das concentrações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Na, Mn, Ni, Pb e Zn nas amostras biológicas passaram a ser realizadas de acordo com metodologia EPA 6020A, utilizando-se espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Analytic Jena).

Também houve modificações nos ensaios toxicológicos ao longo do monitoramento. Como já descrito anteriormente, no Período de Transição (set/out 2019 e jan/fev 2020) não foram realizados ensaios com embriões do peixe *D. rerio* (FET TEST, OECD 236), com anuência prévia da CTBio, em função dos resultados obtidos para o Ano 1 terem sido inconclusivos (Nota Técnica no 8/2019/CTBio/DIBIO/ICMBio [22/03/2019]). Além disso, foi incorporado o ensaio crônico com *C. dubia*, em substituição ao ensaio crônico com o microcrustáceo *D. magna* (ambos os ensaios foram propostos no Plano de Trabalho). Os ensaios são equivalentes do ponto de vista ecotoxicológico, sendo que o ensaio com o microcrustáceo *C. dubia* apresenta a vantagem de avaliar a toxicidade crônica de forma mais rápida e, portanto, ser mais comumente utilizado. Enquanto os testes semicrônicos com o microcrustáceo *C. dubia* tem duração de 7 dias, o ensaio crônico com o microcrustáceo *D. magna* dura 21 dias, porém em ambos os casos se considera a reprodução (número de neonatos) dos cladóceros representativos do zooplâncton.

## 3. RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção são apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest a partir de resultados alcançados ao longo do monitoramento (setembro/2018 – setembro/2022) na área ambiental I. É importante destacar que os indicadores aqui apresentados têm como propósito apresentar de forma mais clara e objetiva os resultados, interpretação e conclusões do monitoramento ao longo do tempo, visando destacar informações de grande relevância para o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, podendo ser usados como ferramentas de gerenciamento pelos gestores ambientais. É também a partir destes indicadores, e outros resultados principais, que são identificados os impactos de relação direta ou indireta com o rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG).

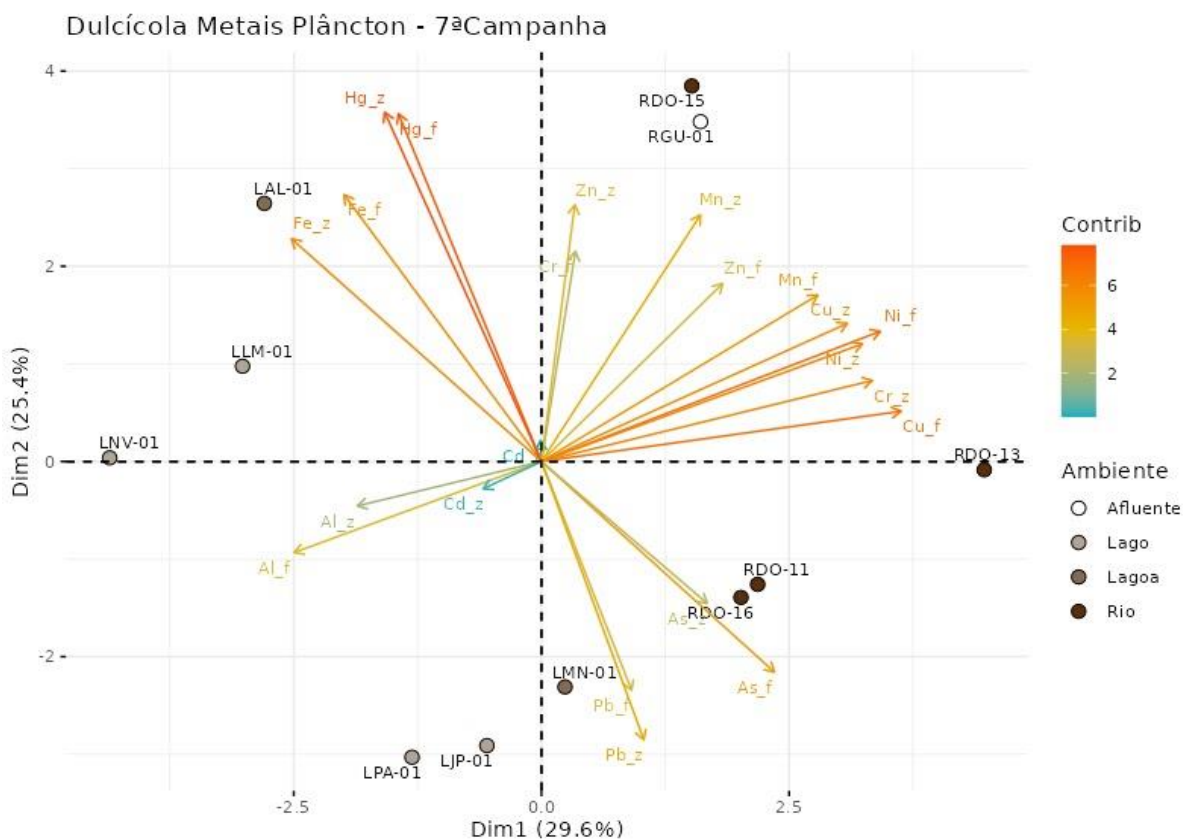
É importante destacar que os indicadores do PMBA/Fest vêm se consolidando ao longo dos quatro anos de monitoramento e que sempre foram discutidos nos relatórios técnicos entregues até então. Entretanto, a partir do novo modelo de relatório solicitado via ofício SEI nº 85/2022-CTBio/DIBIO/ICMBio, proposto via ofício FR.2023.0214 (SEI13515133) e aprovado via ofício SEI nº4/2023-CTBio/DIBIO/ICMBio, a apresentação dos resultados se dará exclusivamente a partir da



apresentação dos indicadores, acompanhados de legenda estendida com a explicação de sua variação espaço-temporal de forma mais direta e objetiva como se segue:

### 3.1 ÍNDICE DE BIOACUMULAÇÃO (*IBR bioacumulação*)

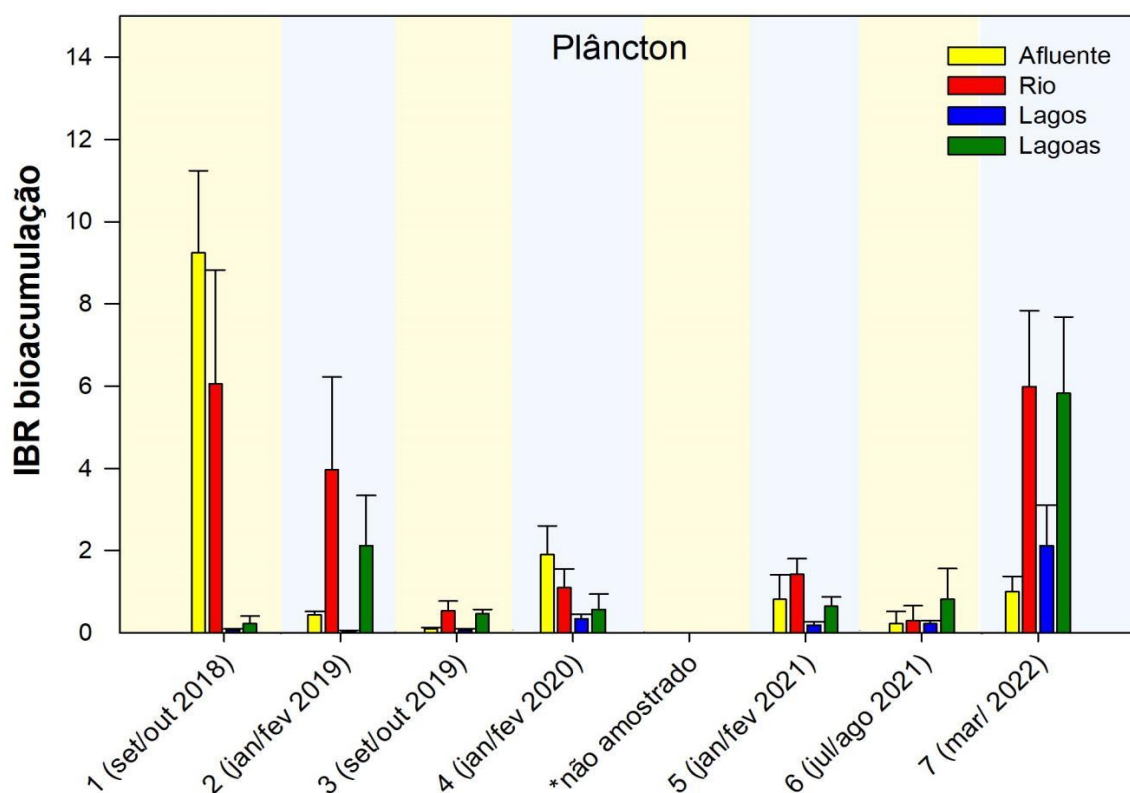
Figura 1: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração de Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Mercúrio (Hg), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) no fitoplâncton (\_f) zooplâncton (\_z) coletado nas estações amostrais dulcícolas durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar/2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01 e LMN-01).



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 29,6% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 25,4% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 53,9% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise dos quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis de bioacumulação de metais e As na comunidade planctônica. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. Por exemplo, o quadrante superior direito é caracterizado por altas concentrações de Ni, Zn, Cu, Cr e Mn no plâncton coletado nas estações amostrais RGU-01 e RDO-15. No lado oposto, o quadrante que agrupa a

comunidade planctônica coletada nas estações amostrais LAL-01, LLM-01 e LNV-01 é caracterizado por altas concentrações de Hg e Fe.

Figura 2: Valores médios do Índice de bioacumulação de metais e As (IBR bioacumulação) no plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) coletado nos diferentes setores da malha amostral dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar/2022 – estação chuvosa). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01 e LMN-01).



No período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), foram observados os maiores níveis de bioacumulação de metais, com destaque para o As, Fe, Cr e Pb no plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) nos setores Rio e Lagoas. Também observa-se que os setores Lagos e Lagoas apresentaram os maiores valores de IBR bioacumulação quando comparados àqueles observados nas campanhas anteriores, sugerindo um efeito sazonal, possivelmente relacionado com o maior aporte de água do Rio Doce para estes ambientes lacustres adjacentes e/ou maior remobilização dos sedimentos neste último período (Campanha 7 - mar 2022), o qual foi marcado por chuvas intensas na região monitorada.



Figura 3: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice de bioacumulação de metais e As (IBR bioacumulação) no plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) coletado nos diferentes setores da malha amostral dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar/ 2022 – estação chuvosa), mostrando a variação espaço temporal de cada metal e contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01 e LMN-01).

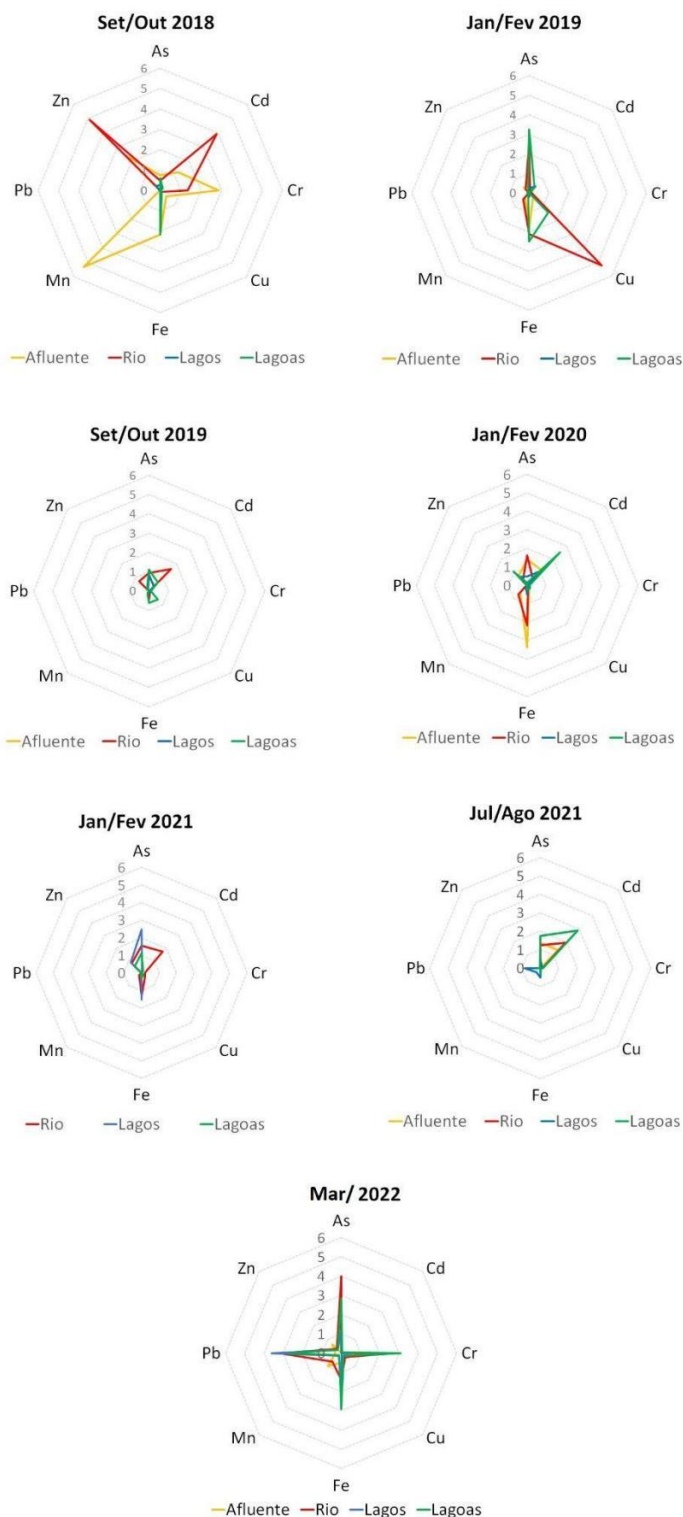
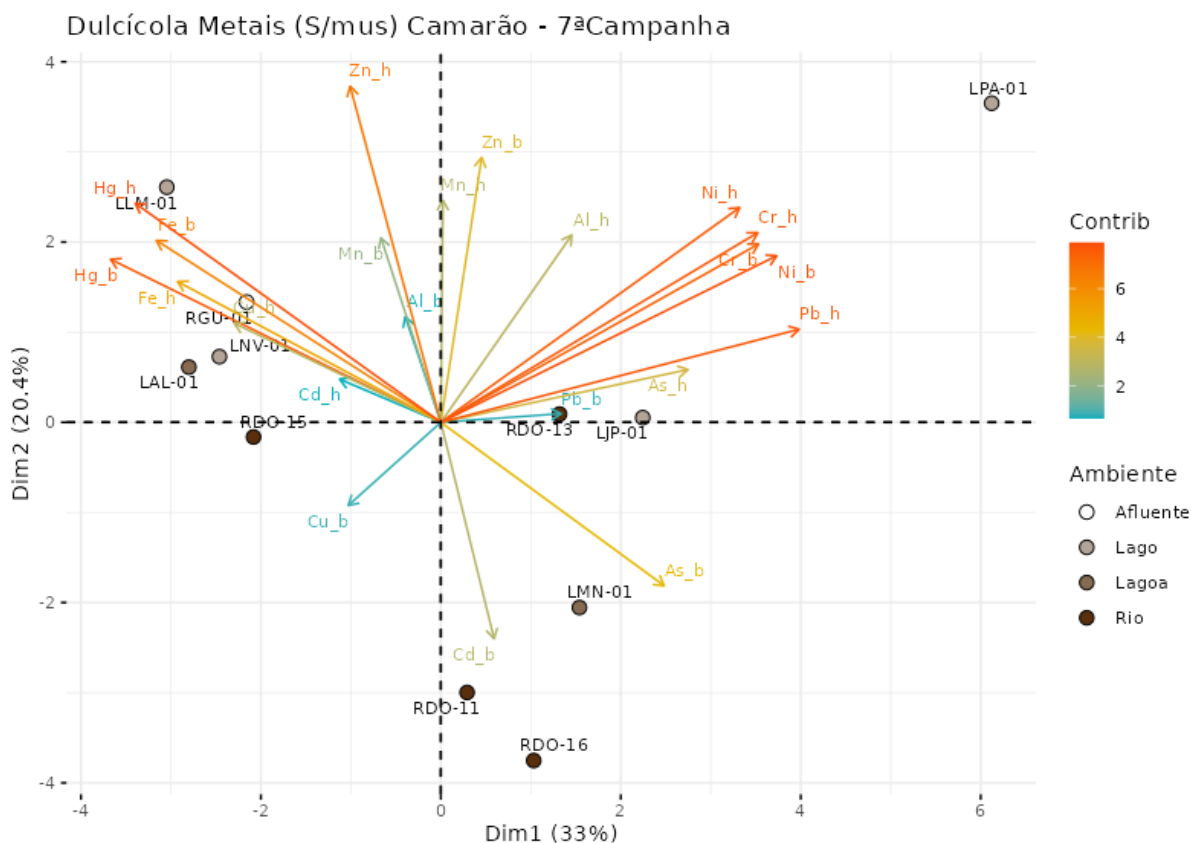


Tabela 5: Concentração média de metais (mg.Kg-1) em amostras de zooplâncton coletadas nos diferentes setores do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 - período seco), Campanha 2 (jan/fev 2019- período chuvoso), Campanha 3 (set/out 2019- período seco), Campanha 4 (jan/fev 2020 - período chuvoso), Campanha 5 (jan/fev 2021 - período chuvoso), Campanha 6 (jul/ago 2021 – período seco) e Campanha 7 (mar/ 2022 – período chuvoso) do Projeto Ecotoxicologia do PMBA/Fest, comparadas com amostras de zooplâncton coletadas na foz do Rio Doce antes da chegada dos rejeitos oriundos do rompimento da barragem de Fundão (Bianchini, 2019). Concentrações dos metais abaixo dos dados pretéritos estão destacadas em verde, enquanto concentrações acima dos valores pretéritos estão destacadas em vermelho. Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01, LMN-01 e LAO-02). Fonte: Bianchini, A. (2019). Monitoramento dos efeitos ecotoxicológicos da pluma de sedimentos oriunda da foz do Rio Doce sobre o ambiente marinho. Relatório Técnico-Científico - FURG/ICMBio, Rio Grande, RS.

Fonte de Dados	Período de coleta	Localidades	Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb
Dados pretéritos à chegada dos rejeitos	Expedição ICMBio (nov/2015)	Foz do Rio Doce	Zooplâncton	0.1210	0.0011	0.1500	0.0690	15.5500	6.6840	0.0053
Dados PMBA - Fest (Ecotoxicologia)	Campanha 1 (set/out 2018)	Afluente	Zooplâncton	0.1936	0.1073	5.1478	2.2843	123.5623	124.6489	0.0731
		Rio Doce		0.1225	0.1585	0.0253	0.0985	306.1952	0.4602	0.0455
		Lagos		0.0198	0.0187	0.0315	0.1906	14.1911	0.9178	0.0890
		Lagoas		0.1440	0.0256	0.0762	1.1130	229.4271	1.1148	0.0956
	Campanha 2 (jan/fev 2019)	Afluente	Zooplâncton	0.0218	0.0301	0.2721	3.2772	107.3269	20.2887	0.0141
		Rio Doce		0.5198	0.0203	0.0347	55.5461	198.5319	41.1916	0.0227
		Lagos		0.0333	0.0487	0.0490	0.1974	14.7858	2.4845	0.0160
		Lagoas		0.4786	0.0427	0.0079	10.3561	265.6681	8.7931	0.1698
	Campanha 3 (set/out 2019)	Afluente	Zooplâncton	0.0198	0.0694	0.0162	0.3840	27.2844	4.6578	0.0140
		Rio Doce		0.1333	0.2177	0.0534	0.5669	50.0551	3.1173	0.0090
		Lagos		0.1415	0.0452	0.0212	0.2687	12.9926	1.2878	0.0216
		Lagoas		0.1369	0.0641	0.2523	6.9925	48.2001	12.3412	0.0119
	Campanha 4 (jan/fev 2020)	Afluente	Zooplâncton	0.0413	0.1461	0.0347	0.8164	224.5134	42.8602	0.0819
		Rio Doce		0.1641	0.0412	0.6008	0.5174	143.1363	52.0499	0.1057
		Lagos		0.0821	0.1353	0.0491	0.5448	40.6039	10.3113	0.0243
		Lagoas		0.0263	0.1680	0.2923	1.4917	17.7705	2.3541	0.0051
		Afluente	Zooplâncton	0.2298	0.0138	0.0501	0.2265	75.2044	1.9800	0.0861

Fonte de Dados	Período de coleta	Localidades	Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb
	Campanha 5 (jan/fev 2021)	Rio Doce		0.2879	0.1438	0.4972	2.2510	87.0017	14.8098	0.0213
		Lagos		0.1290	0.0205	0.0358	0.6341	20.4479	7.0374	0.0573
		Lagoas		0.0851	0.0292	0.0310	1.5755	9.8632	1.0453	0.0264
	Campanha 6 (jan/fev 2021)	Afluente	Zooplâncton	0.1835	0.1157	0.0463	0.0500	1.4796	0.1183	0.1784
		Rio Doce		0.1534	0.1535	0.2508	0.2840	1.2162	0.2770	0.2211
		Lagos		0.0719	0.0208	0.1409	0.3441	22.6193	12.6890	1.2953
		Lagoas		0.2464	0.2513	0.2394	0.5129	11.9390	0.2645	0.3801
	Campanha 7 (mar/ 2022)	Afluente	Zooplâncton	0.0050	0.0140	3.9060	0.9089	31.6494	61.2347	0.5453
		Rio Doce		0.5661	0.0108	5.0498	1.6957	85.2499	40.6163	11.6955
		Lagos		0.1504	0.0151	1.3972	0.4293	147.9425	13.4954	11.3352
		Lagoas		0.4362	0.0158	1.2212	0.9551	148.5089	12.5587	13.4984

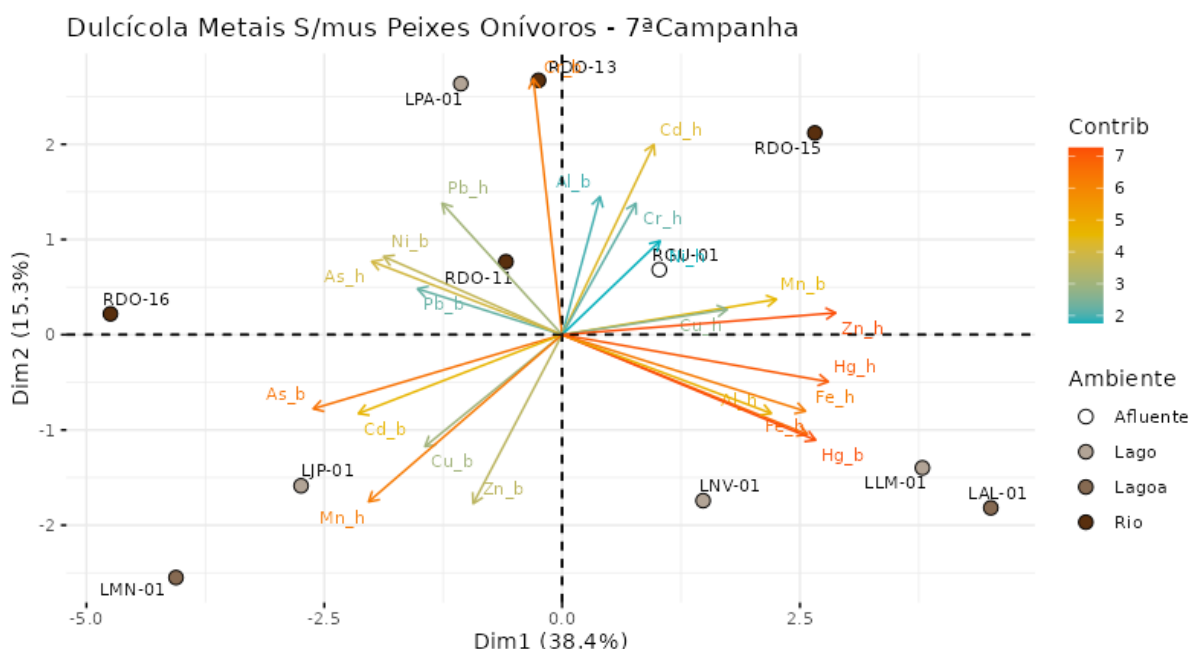
Figura 4: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração de Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Mercúrio (Hg), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) em brânquias (\_b) e hepatopâncreas (\_h) de camarões coletados nas estações amostrais dulcícolas durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar/2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandú (RGU-01), Lago Nova (LNV-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA-01), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandú (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01 e LMN-01).



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 33% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 20,4% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 53,4% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis de biocumulação de metais e As nos tecidos de camarões dulcícolas. A ordenação gerada pela PCA com os resultados de metais e As nos tecidos de camarões coletados durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022) evidenciou um perfil de contaminação difuso, onde os diferentes elementos estiveram associados a diferentes pontos da malha amostral dulcícola. Por exemplo, as concentrações de Fe e Hg nas brânquias e hepatopâncreas estiveram melhor associadas aos pontos de amostragem no Lago Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lagoa Areal (LAL-01) e Rio Guandu (RGU-01), enquanto as concentrações de

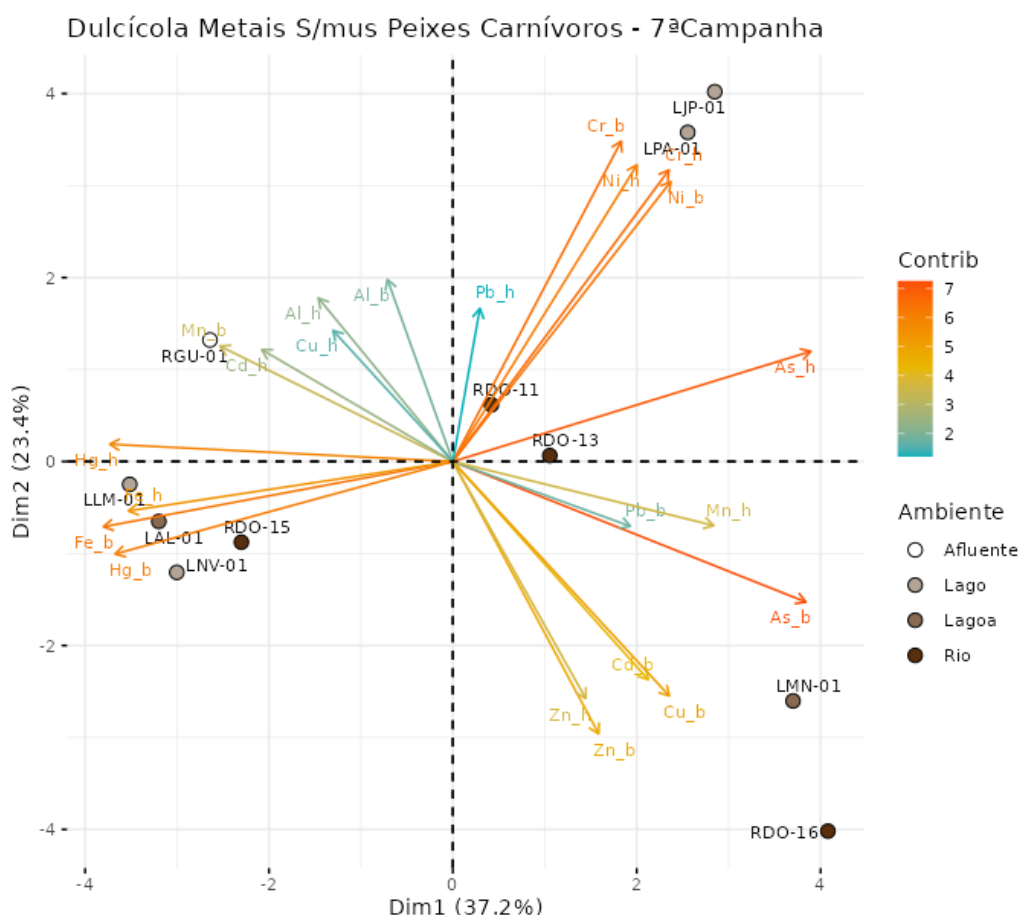
Cr, Pb e Ni, em ambos os tecidos e de Al e As no hepatopâncreas mostraram-se melhor associadas aos pontos de amostragem no Lago Palmas (LPA-01), Juparanã (LJP-01) e Rio Doce, em Colatina (RDO-13). Já as concentrações de As e Cd nas brânquias mostraram uma melhor relação com o ponto de amostragem na Lagoa Monsarás (LMN-01) e com os pontos de amostragem no Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11) e em seu estuário (RDO-16).

Figura 5: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração de Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Mercúrio (Hg), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) em brânquias (\_b) e hepatopâncreas (\_h) de peixes do grupo trófico I (herbívoros/onívoros) coletados nas estações amostrais dulcícolas durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar/2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandú (RGU-01), Lago Nova (LNV-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA-01), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandú (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01 e LMN-01). A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados.



No presente caso, o primeiro componente responde por 38,4% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 15,3% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 53,7% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis de biocumulação de metais e As nos tecidos dos peixes onívoros. Um padrão difuso de bioacumulação pode ser observado nas espécies de peixes agrupadas na guilda dos onívoros/herbívoros, onde as concentrações de diferentes elementos mostraram-se melhor associadas às diferentes pontos da malha amostral dulcícola, não sendo possível estabelecer um padrão espacial claro de bioacumulação.

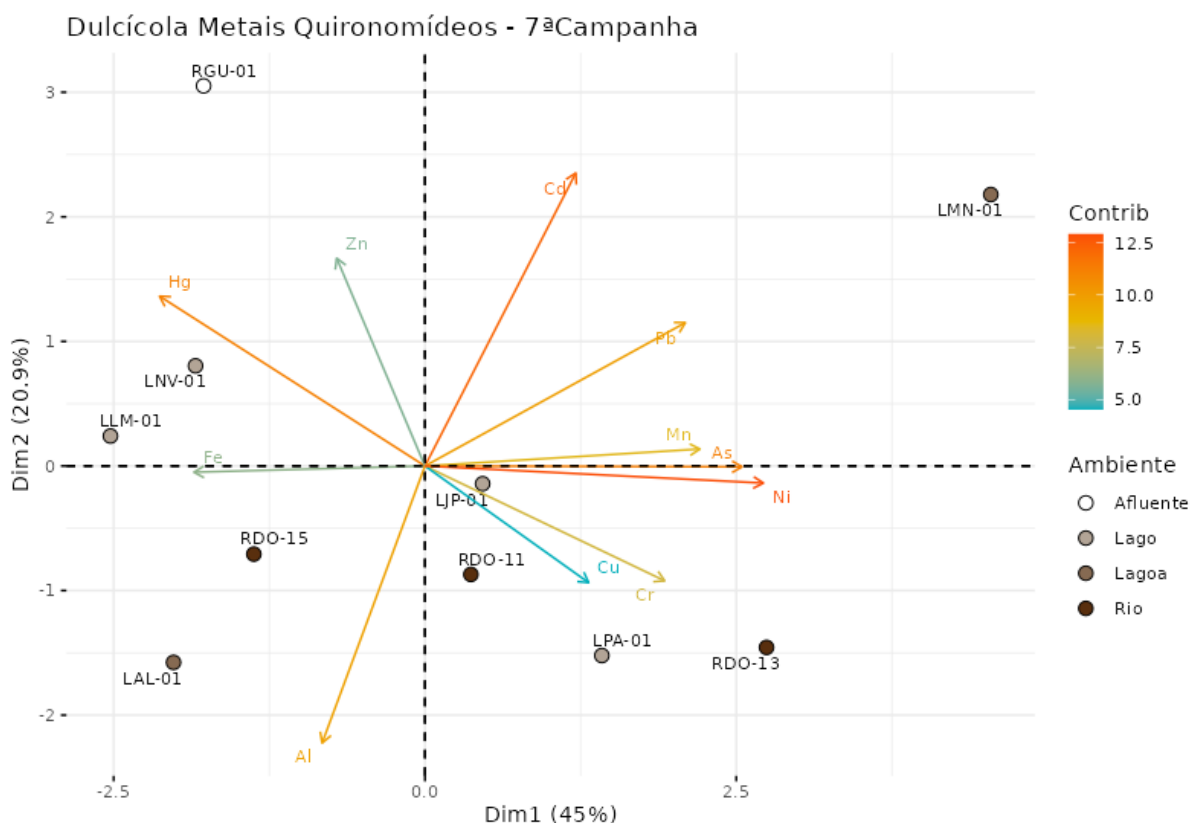
Figura 6: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração de Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Mercúrio (Hg), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) em brânquias (\_b) e hepatopâncreas (\_h) de peixes do grupo trófico II (carnívoros) coletados nas estações amostrais dulcícolas durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar/2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandú (RGU-01), Lago Nova (LNV-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA-01), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandú (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01 e LMN-01). A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados.



No presente caso, o primeiro componente responde por 37,2% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 23,4% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 60,6% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis de biocumulação de metais e As nos tecidos de peixes carnívoros. Para a guilda de peixes carnívoros, alguns agrupamentos gerados pela PCA são mais evidentes. Por exemplo, as concentrações de Fe e Hg no fígado e brânquias dos peixes estiveram melhor associadas aos pontos amostrais no Lago Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lagoa Areal (LAL-01) e Rio Doce em Linhares (RDO-15), enquanto as concentrações de Ni e Cr, em ambos os tecidos, mostraram melhor associação com os pontos amostrais nos Lagos Juparanã (LJP-

01) e Palmas (LPA-01), enquanto as concentrações de Cu, Cd, Zn, As e Pb nas brânquias e de Mn e Zn no fígado estiveram melhor associadas aos pontos de amostragem na Lagoa Monsarás (LMN-01) e na região estuarina do Rio Doce (RDO-16).

Figura 7: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração dos elementos Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Mercúrio (Hg), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) em larvas de quironomídeos coletadas nas estações amostrais do ambiente dulcícola e estuário durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Os símbolos representam os indivíduos utilizados na análise categorizados por localidade. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13) e Rio Doce em Linhares (RDO-15). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02). A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados.

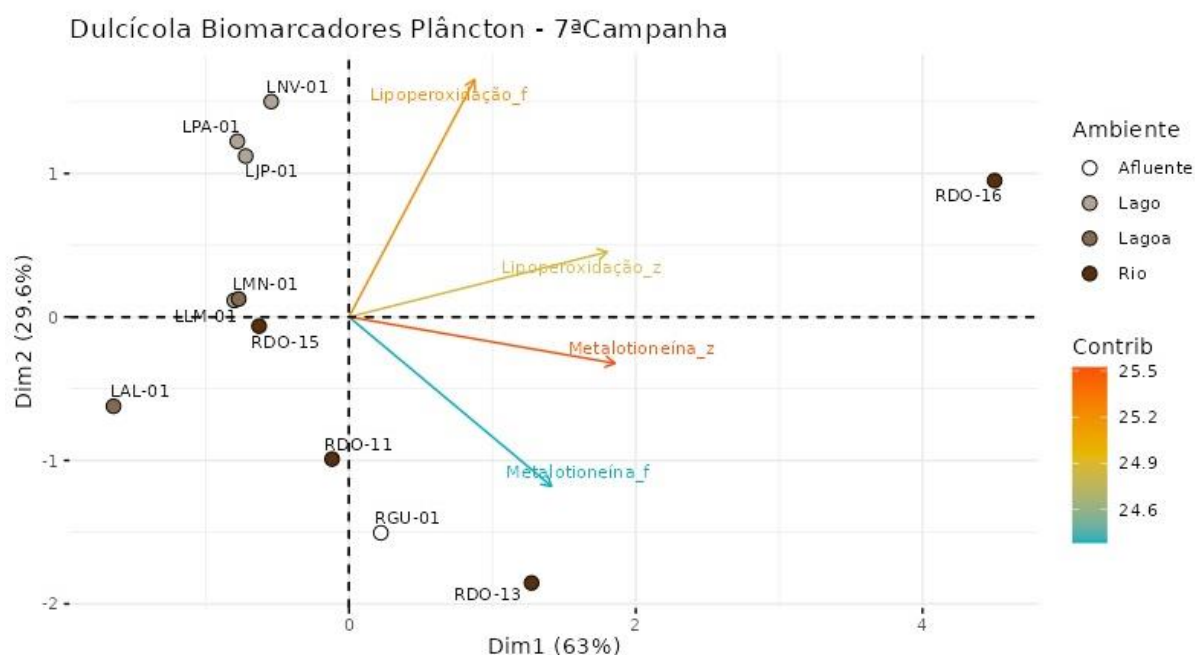


No presente caso, o primeiro componente responde por 45% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 20,9% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 65,9% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis de bioacumulação de metais e As nas larvas de quironomídeos. De maneira geral, a ordenação gerada pela PCA indicou um padrão difuso de bioacumulação.



### 3.2 ÍNDICE DE RESPOSTA BIOLÓGICA (*IBR biomarcador*)

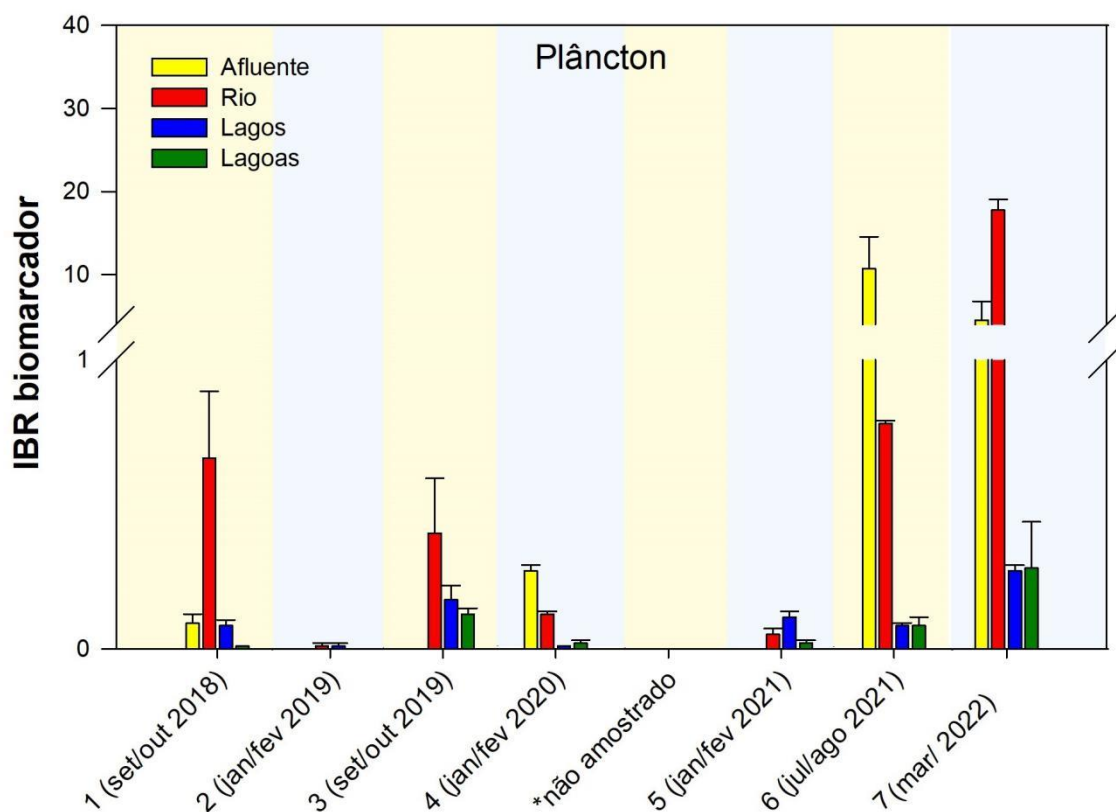
Figura 8: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os biomarcadores de lipoperoxidação (LPO) e concentração de metalotioneínas (MT) no fitoplâncton (*\_f*) e zooplâncton (*\_z*) coletados nas estações amostrais do ambiente dulcícola e estuário durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Os símbolos representam os indivíduos utilizados na análise categorizados por localidade. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13 e RDO-15), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01).



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 63% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 29,6% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 92,6% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) na comunidade plânctônica. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. Por exemplo, o quadrante superior direito é caracterizado por altos valores lipoperoxidação (LPO) no plâncton coletado na estação RDO-16. No quadrante inferior direito, pode ser observado o agrupamento da comunidade planctônica coletada nas estações amostrais RGU-01 e RDO-13, o qual está caracterizado por um aumento na concentração de metalotioneínas (MTs), moléculas responsáveis pela detoxificação de metais

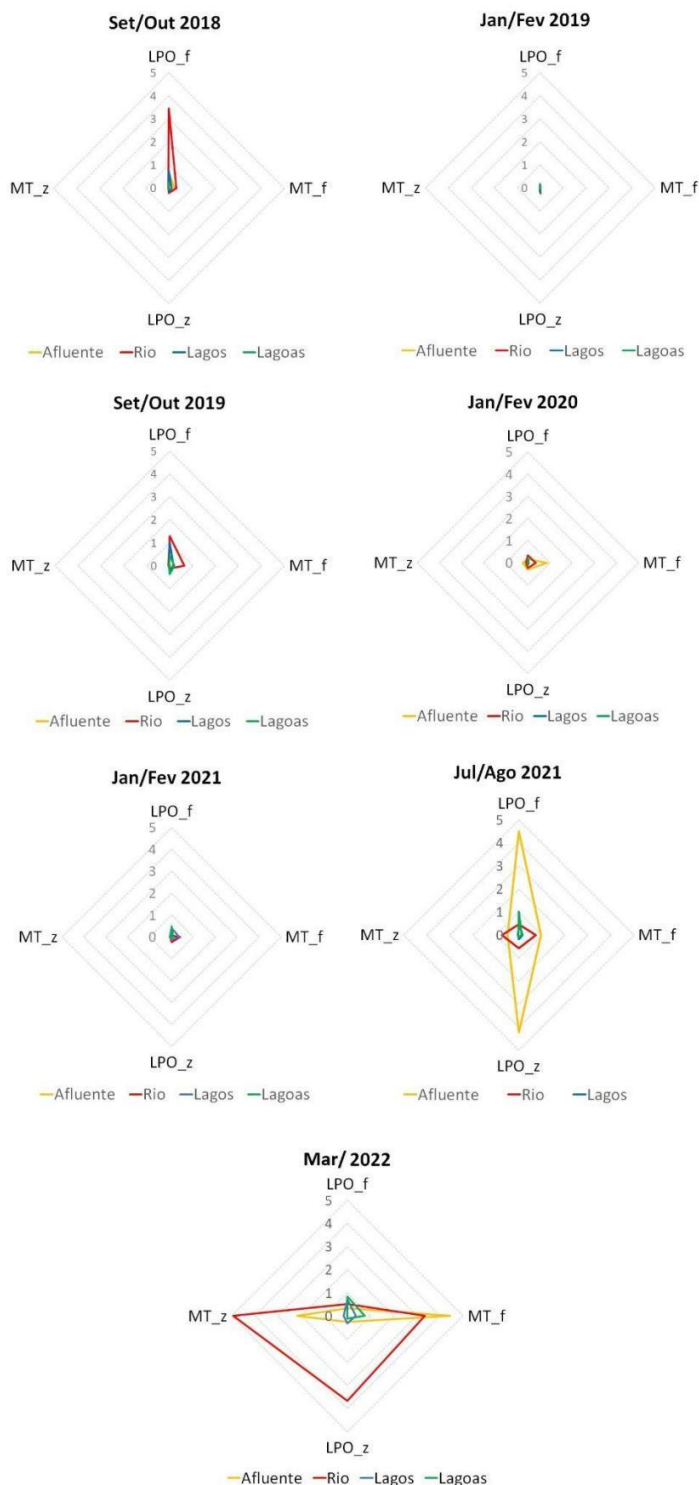


Figura 9: Valores médios do Índice de Resposta Biológica (IBR biomarcador) no plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) coletado na malha amostral do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13 e RDO-15), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01).



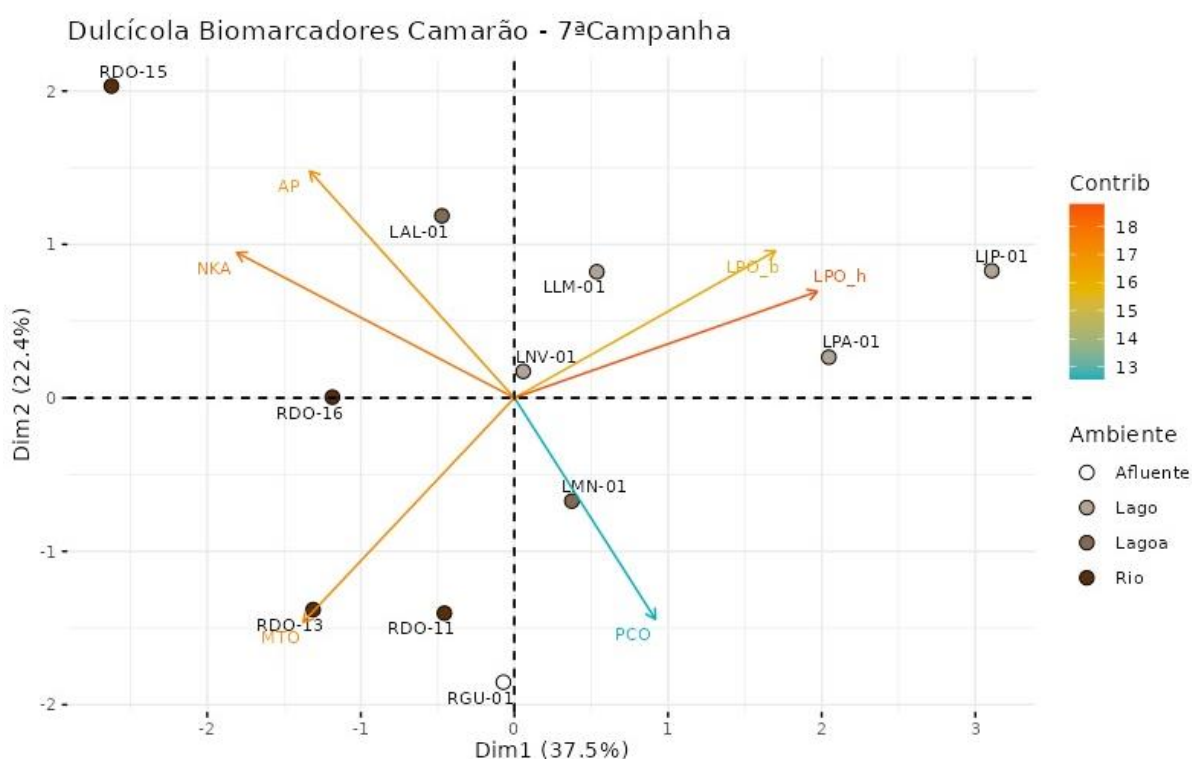
O IBR biomarcador mostrou um aumento da resposta biológica dos organismos planctônicos coletados nos setores Rio e Afluente nas últimas campanhas avaliadas: período seco 2021 (Campanha 6 - jul/ago 2021) e período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022)

Figura 10: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice de Resposta Biológica (IBR biomarcador) no plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) coletado na malha amostral do ambiente dulcícola (Afluente: RGU-01; Rio: RDO-11, RDO-13; RDO-15 e RDO-16; Lagos: LLM-01; LPA; LJP-01 e LNV-01; Lagoas: LAL-01 e LMN-01) durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa) mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13 e RDO-15), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01).



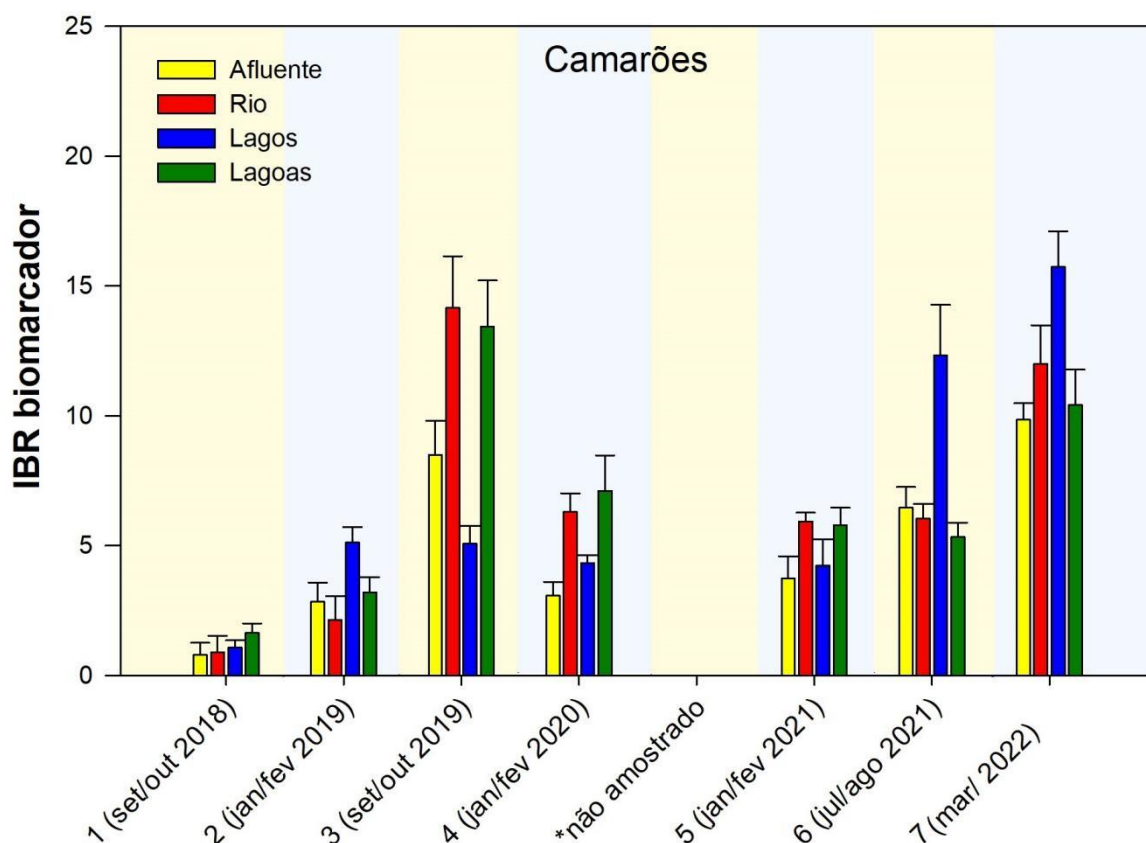
O IBR biomarcador mostrou um aumento da resposta biológica dos organismos planctônicos coletados nos setores Rio e Afluente nas últimas campanhas avaliadas: período seco 2021 (Campanha 6 - jul/ago 2021) e período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022).

Figura 11: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os biomarcadores lipoperoxidação (LPO) nas brânquias (LPO\_b) e no hepatopâncreas (LPO\_h, concentração de metalotioneínas no hepatopâncreas (MT\_h), oxidação de proteínas no músculo (PCO), atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias (NKA\_b) e dano no DNA em hemócitos (AP) em camarões coletados durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Os símbolos representam os indivíduos utilizados na análise categorizados por localidade. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago Palmas (LPA-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13 e RDO-15), Lago (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoa (LAL-01).



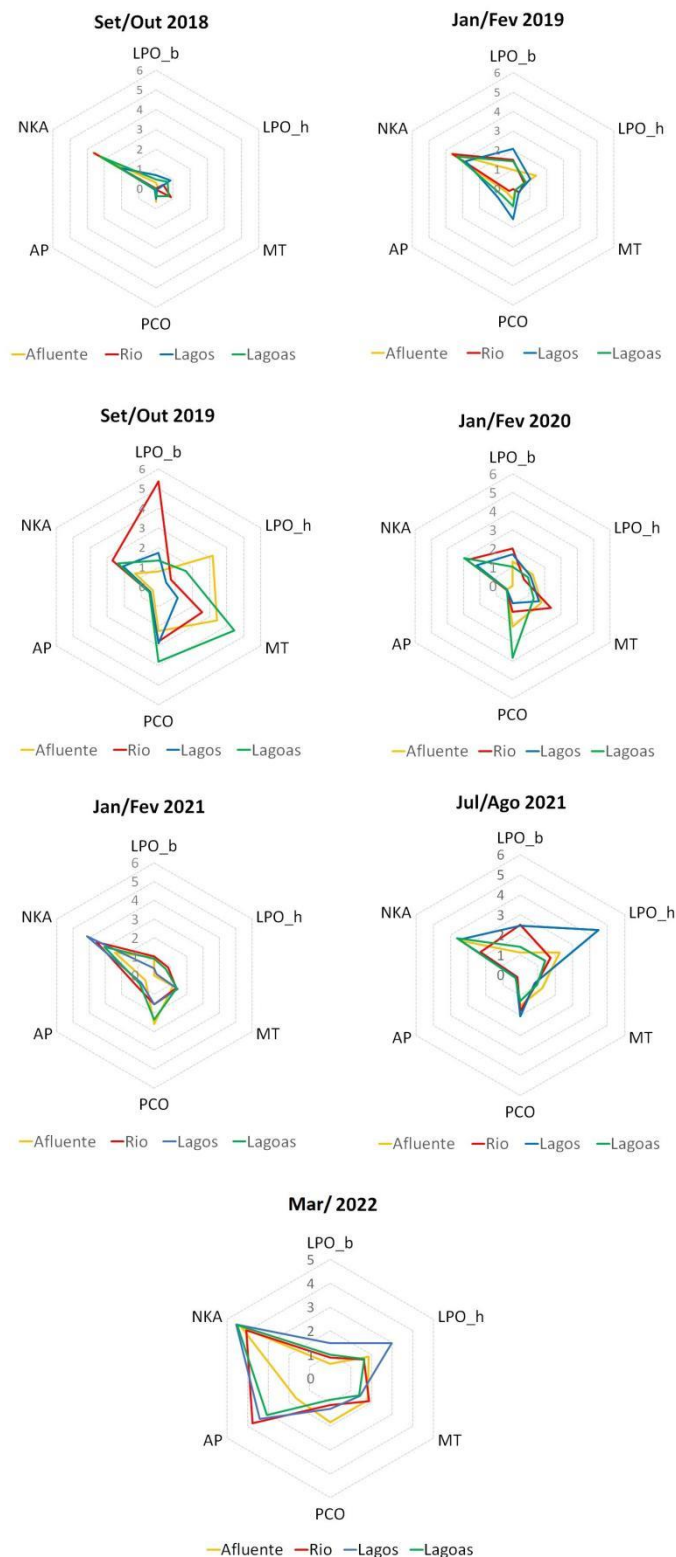
A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 37,5% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 22,4% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 59,9% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) nos camarões dulcícolas. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável.

Figura 12: Valores médios do Índice de Resposta Biológica (IBR biomarcador) para camarões coletados na malha amostral do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02)..



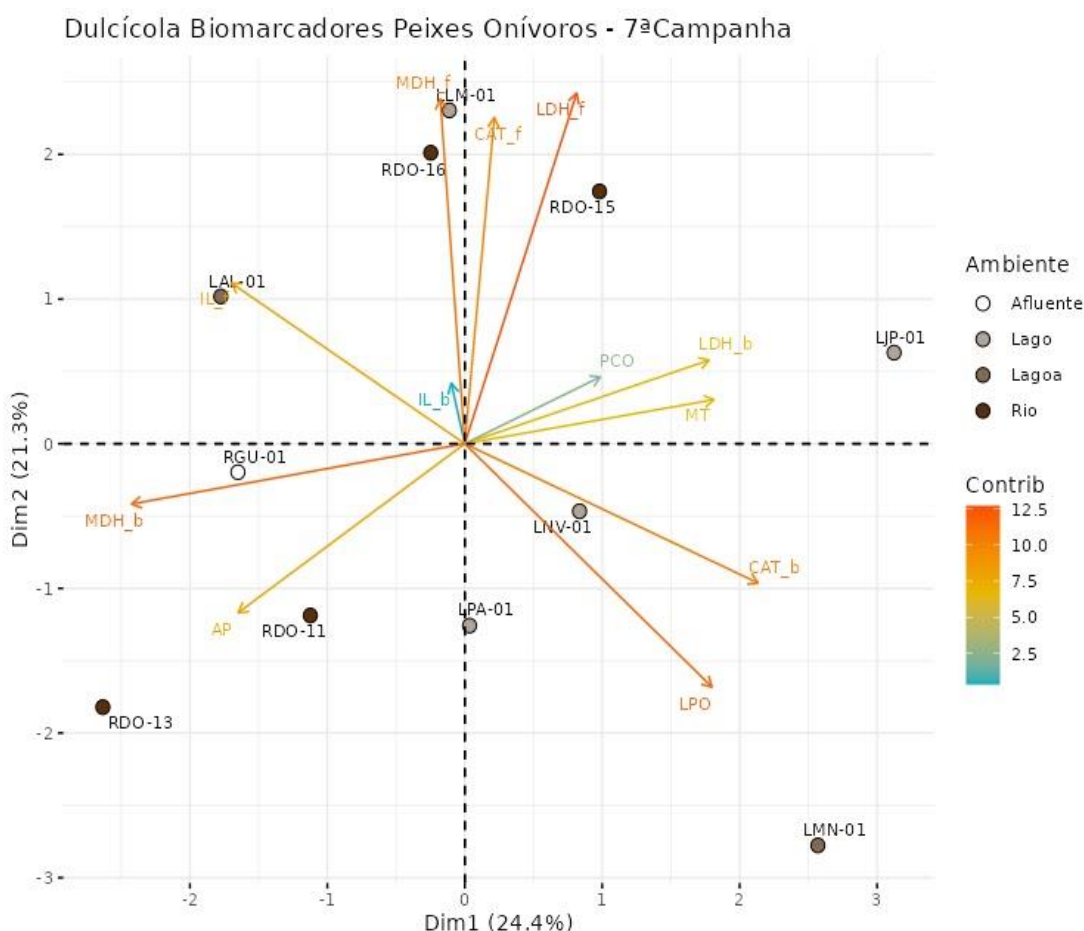
Nos camarões, os valores médios e perfis do IBR biomarcador foram semelhantes no período seco de 2021 (Campanha 6 - jul/ago 2021) e período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), mas com destaque para o setor Lagos, que apresentou os maiores valores do índice. A contribuição de cada biomarcador para a composição do resultado do índice pode ser visualizada na Figura 13

Figura 13: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice de Resposta Biológica (IBR biomarcador) para camarões coletados na malha amostral do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa), mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02).



Nos camarões, os valores médios e perfis do IBR biomarcador foram semelhantes no período seco de 2021 (Campanha 6 - jul/ago 2021) e período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), mas com destaque para o setor Lagos, que apresentou os maiores valores do índice. Com relação à contribuição dos diferentes biomarcadores, é notável o aumento de danos no DNA (sítios AP) e a diminuição da atividade da NKA nas brânquias desses crustáceos durante o último período chuvoso (Campanha 7 - mar 2022). Cabe ressaltar que neste último período monitorado, foram observados níveis mais elevados de danos DNA (sítios AP) nos organismos coletados nos setores Rio, Lagos e Lagoas, sendo este resultado inédito no âmbito do presente monitoramento. Também se destaca o aumento observado no nível de lipoperoxidação (LPO) no hepatopâncreas dos camarões coletados no setor Lagos nas duas últimas campanhas (Campanha 6 - jul/ago 2021 e Campanha 7 - mar 2022), indicando uma intensificação temporal dos danos oxidativos em crustáceos destes ecossistemas lacustres.

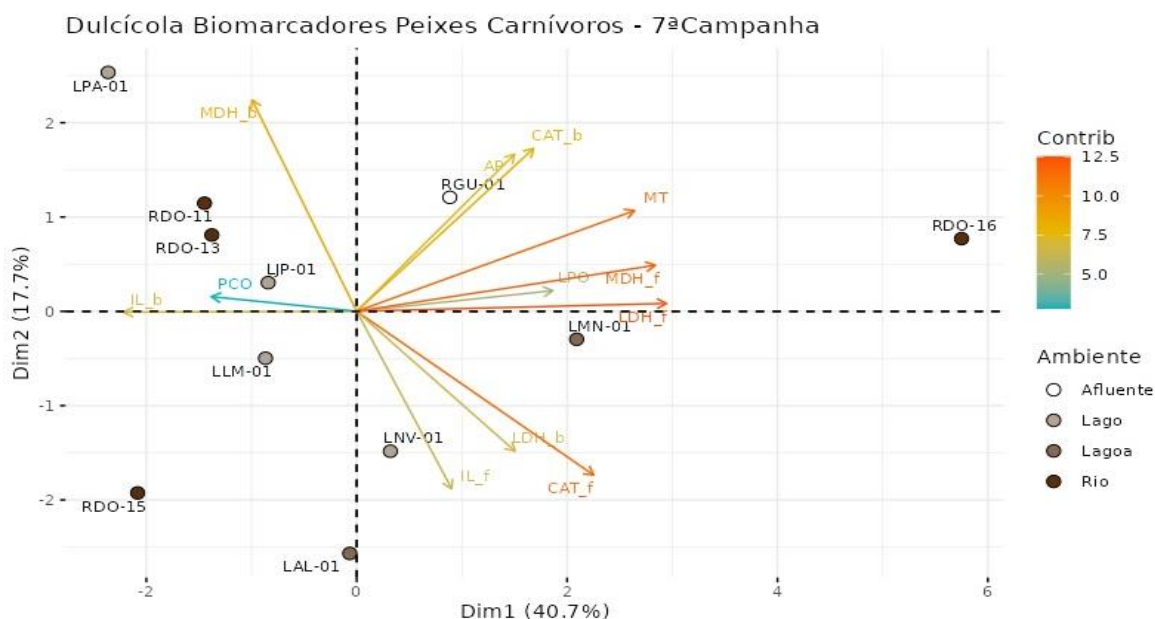
Figura 14: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os biomarcadores lipoperoxidação (LPO) e concentração de metalotioneínas (MT) no fígado, oxidação de proteínas (PCO) no músculo, dano no DNA (AP) no sangue, atividade das enzimas catalase (CAT), lactato desidrogenase (LDH) e malato-desidrogenase (MDH) no fígado (\_f) e brânquias (\_b), e índice de alterações histológicas nas brânquias (IL\_b) e no fígado (IL\_f) de peixes do grupo I (onívoros/herbívoros) coletados durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02).





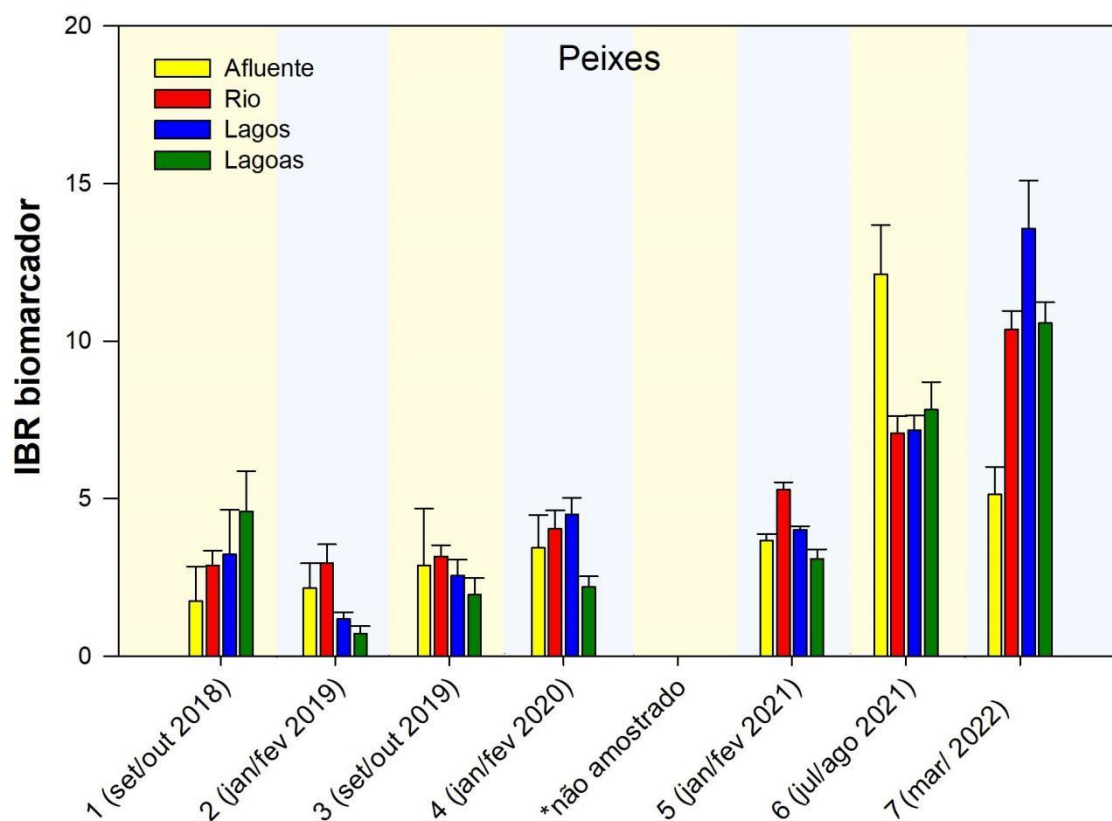
A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 24,4% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 21,3% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 45,7% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualizar da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) nos peixes onívoros/herbívoros. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável.

Figura 15: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os biomarcadores lipoperoxidação (LPO) e concentração de metalotioneínas (MT) no fígado, oxidação de proteínas (PCO) no músculo, dano no DNA (AP) no sangue, atividade das enzimas catalase (CAT), lactato desidrogenase (LDH) e malato-desidrogenase (MDH) no fígado (\_f) e brânquias (\_b), e índice de alterações histológicas nas brânquias (IL\_b) e no fígado (IL\_f) de peixes do grupo II (carnívoros) coletados durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02).



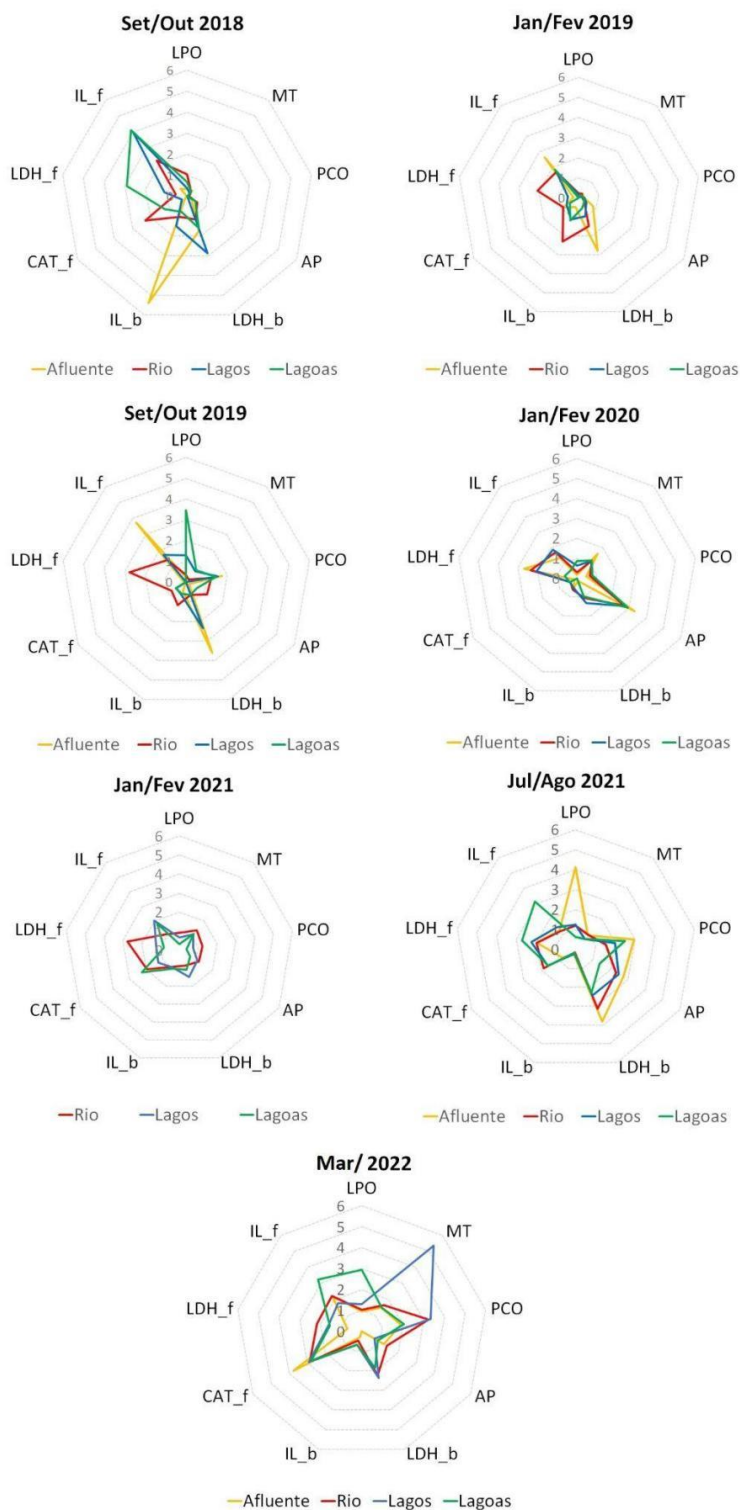
A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 40,7% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 17,7% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 58,4% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) nos peixes carnívoros. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável

Figura 16: Valores médios do Índice de Resposta Biológica (IBR biomarcador) nos peixes (onívoros / herbívoros e carnívoros) coletados na malha amostral do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02).



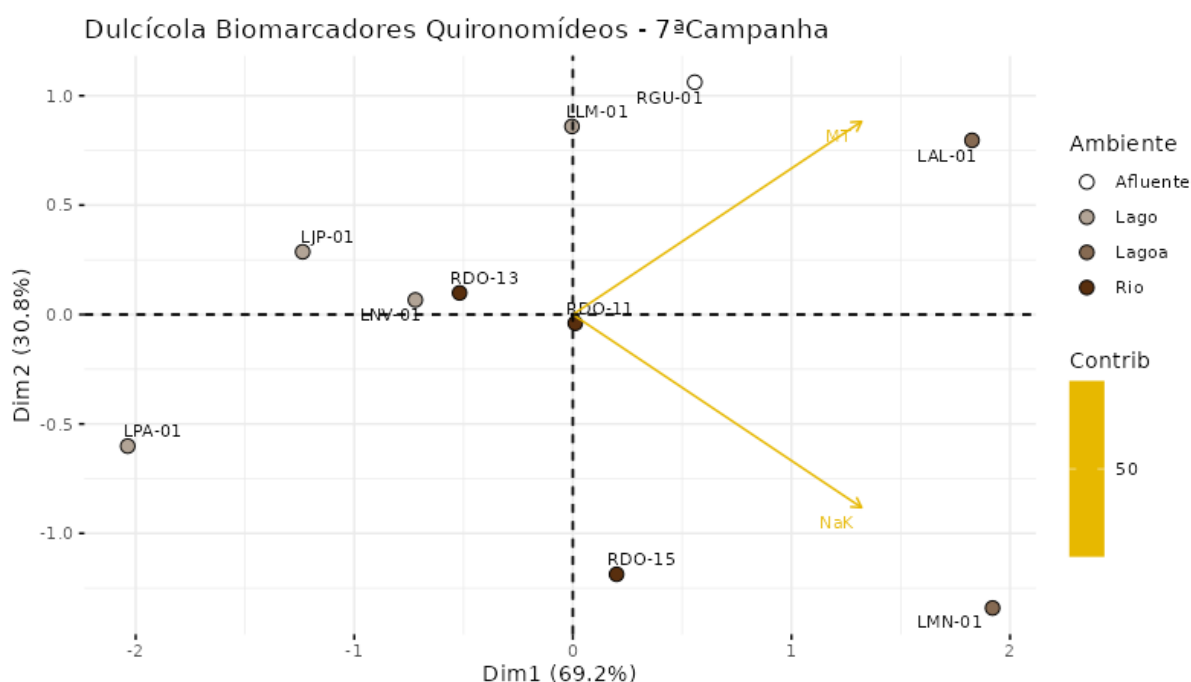
Foi observado um aumento gradual no valor médio do IBR biomarcador para os organismos coletados no setor Rio e, de maneira mais sutil, para aqueles coletados nos setores Lagos e Lagoas, ao longo de todo o monitoramento (2018 a 2022). Semelhante ao que foi observado para os camarões, os peixes coletados no setor Lagos no período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022) apresentaram maior nível de efeito biológico, em relação àqueles coletados demais setores. Este resultado se deve principalmente ao aumento observado no conteúdo de metalotioneínas no fígado destes animais (Figura 17).

Figura 17: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice de Resposta Biológica (IBR biomarcador) nos peixes (onívoros / herbívoros e carnívoros) coletados na malha amostral do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – estação seca), Campanha 2 (jan/fev 2019 – estação chuvosa), Campanha 3 (set/out 2019 – estação seca), Campanha 4 (jan/fev 2020 – estação chuvosa), Campanha 5 (jan/fev 2021 – estação chuvosa), Campanha 6 (jul/ago 2021 – estação seca) e Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa), mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02).



Particularmente no período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), os peixes coletados no setor Lagos apresentaram maior nível de efeito biológico, em relação àqueles coletados nos demais setores. Os resultados indicam um aumento no conteúdo de metalotioneínas no fígado dos organismos coletados na última campanha de monitoramento (Campanha 7 - mar 2022), como uma possível estratégia para detoxificação dos metais que foram bioacumulados.

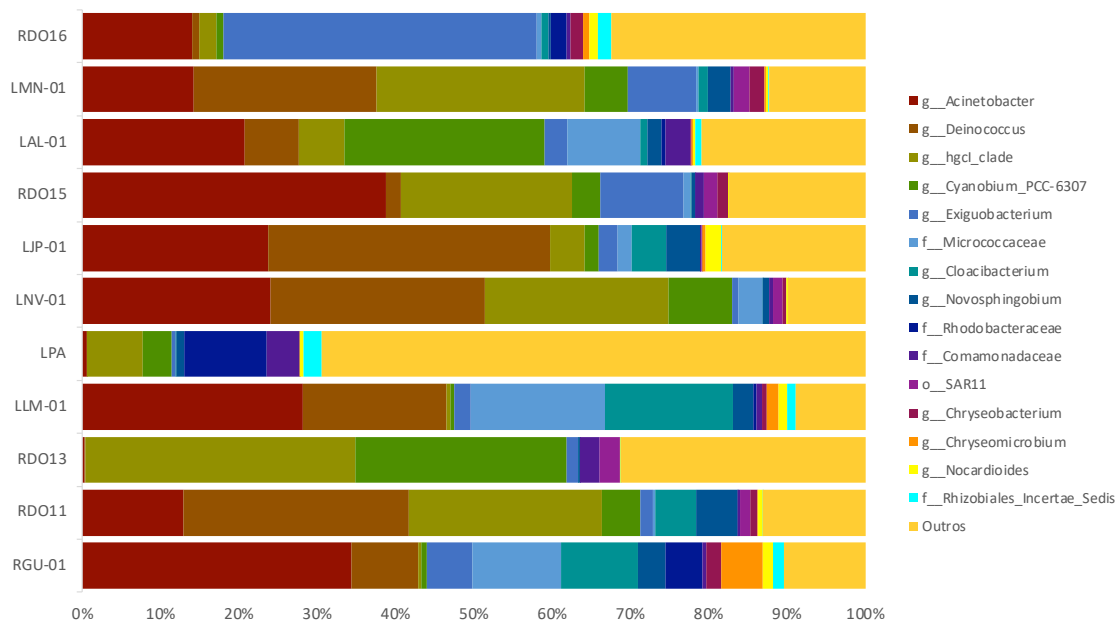
Figura 18: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados biomarcadores (lipoperoxidação [LPO] e atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase [NKA]) em larvas de quironomídeos coletadas nas estações amostrais do ambiente dulcícola e estuário durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Os símbolos representam os indivíduos utilizados na análise categorizados por localidade. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13) e Rio Doce em Linhares (RDO-15). Classificação por setores: Afluente (RGU-01), Rio (RDO-11, RDO-13, RDO-15 e RDO-16), Lagos (LLM-01, LNV-01, LJP-01 e LPA-01) e Lagoas (LAL-01, LMN-01 e LAO-02). A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados.



No presente caso, o primeiro componente responde por 69,2% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 30,8% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 91% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia na visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) nas larvas de quironomídeos. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável.

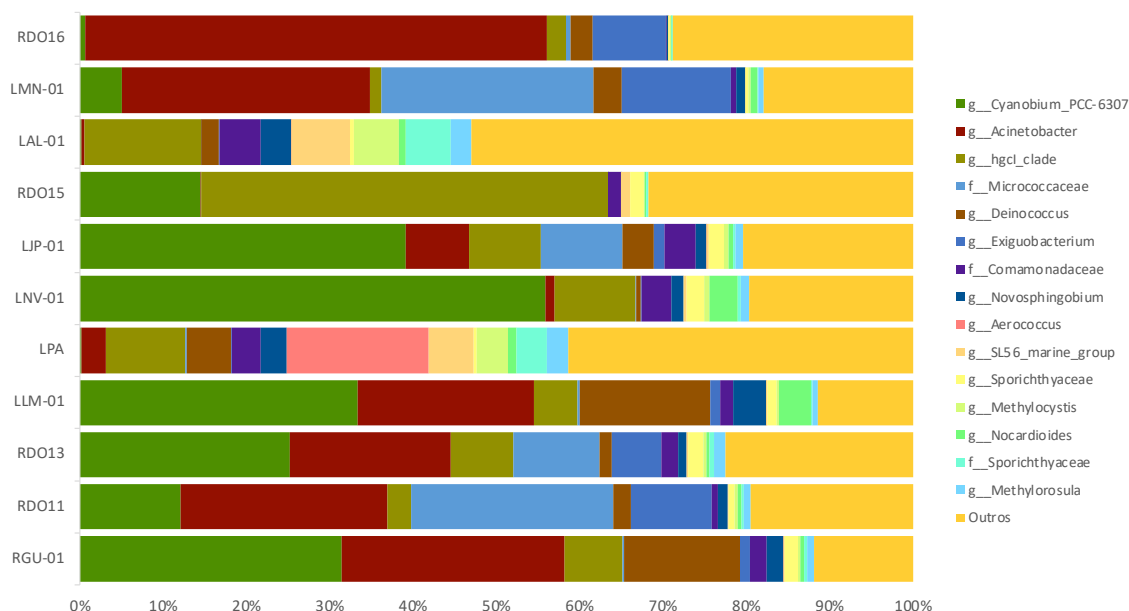
### 3.3 DIVERSIDADE MICROBIANA

Figura 19: Classificação taxonômica da comunidade microbiológica de amostras de água superficial coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). São mostradas as abundâncias relativas dos gêneros bacterianos mais encontrados, enquanto os menos abundantes são identificados como “Outros”. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16).



A análise de abundância relativa dos gêneros encontrados em água de superfície da porção dulcícola durante o último período chuvoso (Campanha 7, mar 2022), revelou predominância dos gêneros bacterianos *Acinetobacter* e *Deinococcus*, seguidos por *hgcl clade* e *Cyanobium PCC-6307*, respectivamente. Os gêneros *Acinetobacter* e *Deinococcus* somente não foram observados em elevada abundância nas estações amostrais RDO-13 (Rio Doce, Colatina) e LPA (Lago Palmas), onde *hgcl clade* e *Cyanobium PCC-6307* tiveram maior prevalência. Destaca-se também a semelhança na distribuição das comunidades bacterianas nas estações amostrais RGU-01 (Rio Guandu) e LLM-01 (Lago do Limão), principalmente pela elevada prevalência de *Micrococcaceae* e *Cloacibacterium*.

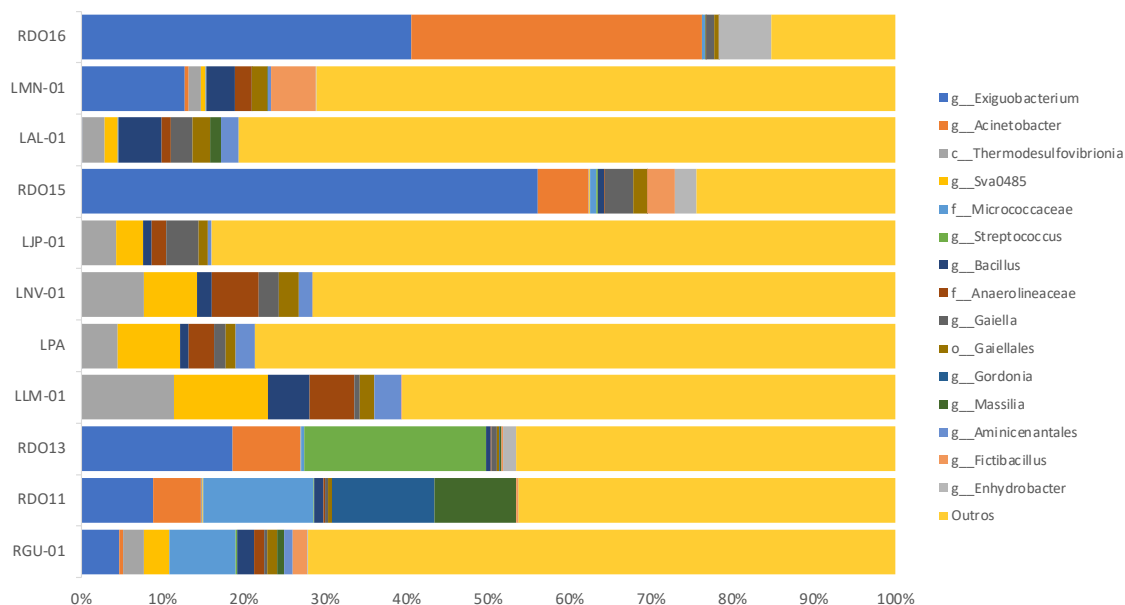
Figura 20: Classificação taxonômica da comunidade microbiológica de amostras de água de fundo coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). São mostradas as abundâncias relativas dos gêneros bacterianos mais encontrados, enquanto os menos abundantes são identificados como "Outros". Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16).



Para água de fundo, foi observado um padrão distinto daquele visto para a água de superfície. Nas amostras de água de fundo, *Cyanobium* PCC-6307 foi o táxon dominante, seguido por *Acinetobacter*, *hgcl\_clade* e *Micrococcaceae*, respectivamente. *Cyanobium* PCC-6307 representou 56 e 39% da população bacteriana nas estações amostrais LNV-01 (Lago Nova) e LJP-01 (Lago Juparanã), respectivamente, enquanto 55% da comunidade microbiológica na estação amostral RDO-16 (Rio Doce, estuário) foi representada por *Acinetobacter*.

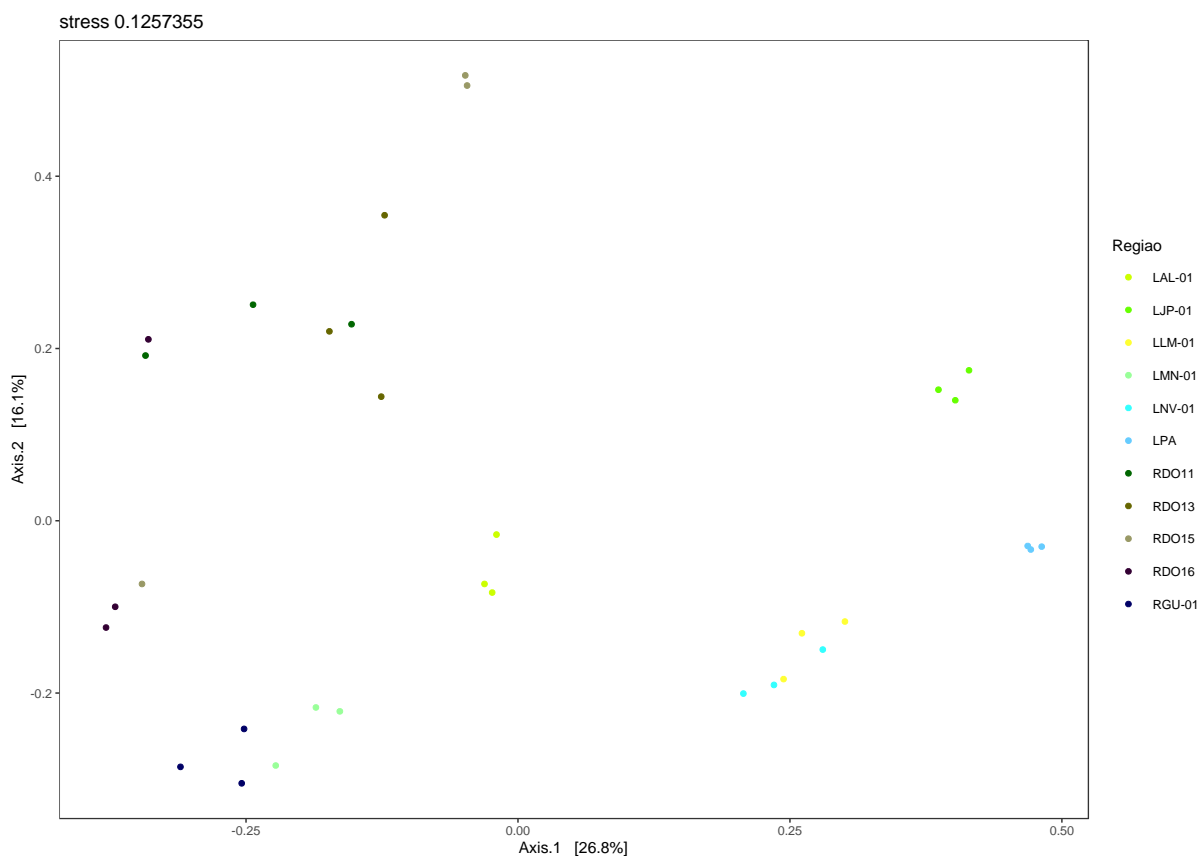


Figura 21: Classificação taxonômica da comunidade microbiológica de amostras de sedimento coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). São mostradas as abundâncias relativas dos gêneros bacterianos mais encontrados, enquanto os menos abundantes são identificados como “Outros”. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16).



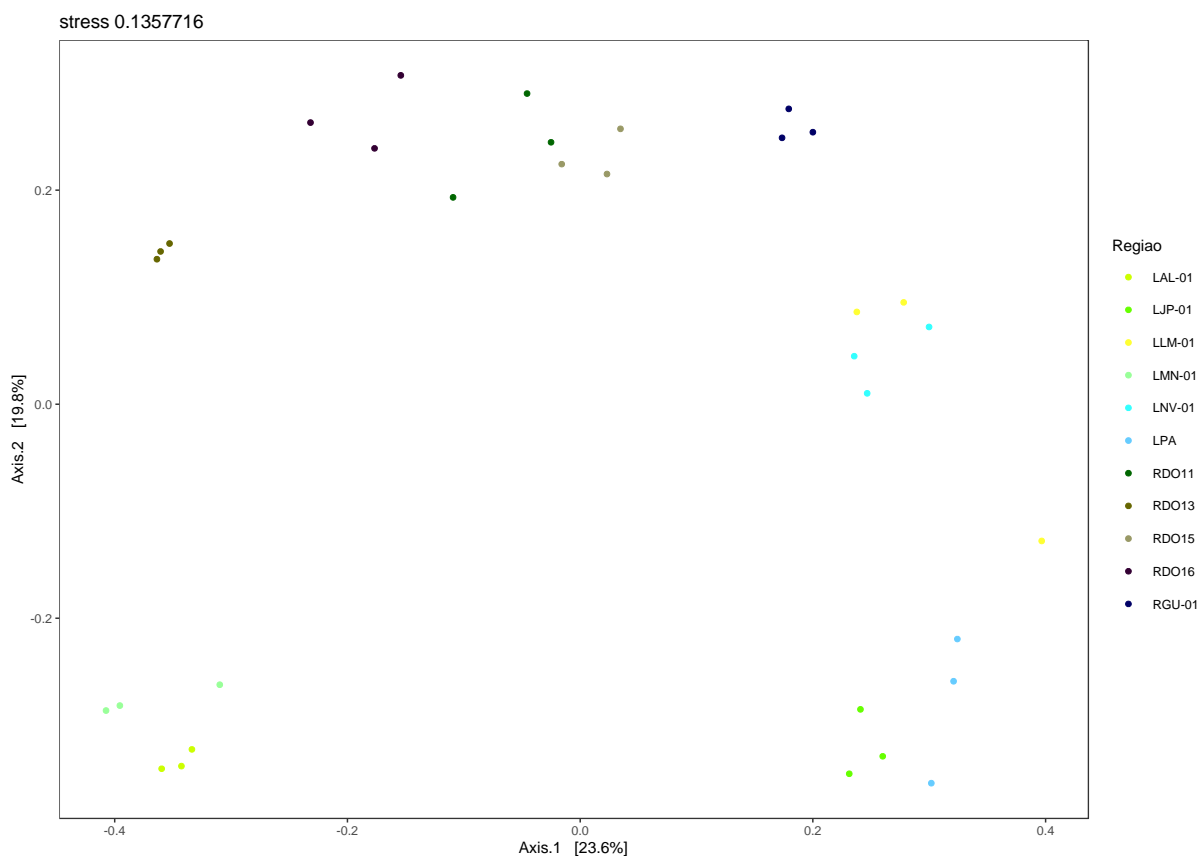
Como já esperado, as amostras de sedimento apresentaram grande diversidade e pouca predominância de grupos bacterianos específicos quando comparadas às amostras de água. Apesar disto, vale ressaltar a presença bastante elevada do táxon *Exiguobacterium* nas amostras de sedimento do Rio Doce (estações amostrais RDO13 – 19% [Colatina]; RDO15 – 56% [Linhares] e RDO16 – 40% [estuário]) e do táxon *Acinetobacter* (estação amostral RDO16 [estuário] – 36%). Cabe lembrar que estes táxons foram anteriormente sugeridos como indicadores da presença de metais oriundos dos rejeitos de minério (RRDM, 2022). O táxon *Anaerolineaceae* também foi observado em amostras de sedimentos das estações amostrais LLM-01 (Lago do Limão), LPA (Lago Palmas), LNV-01 (Lago Palmas) e LJP-01 (Lago Juparanã).

Figura 22: Ordenação gerada por Análise de Componentes Principais (PCA) da comunidade microbiana presente nas amostras de água superficial coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16).



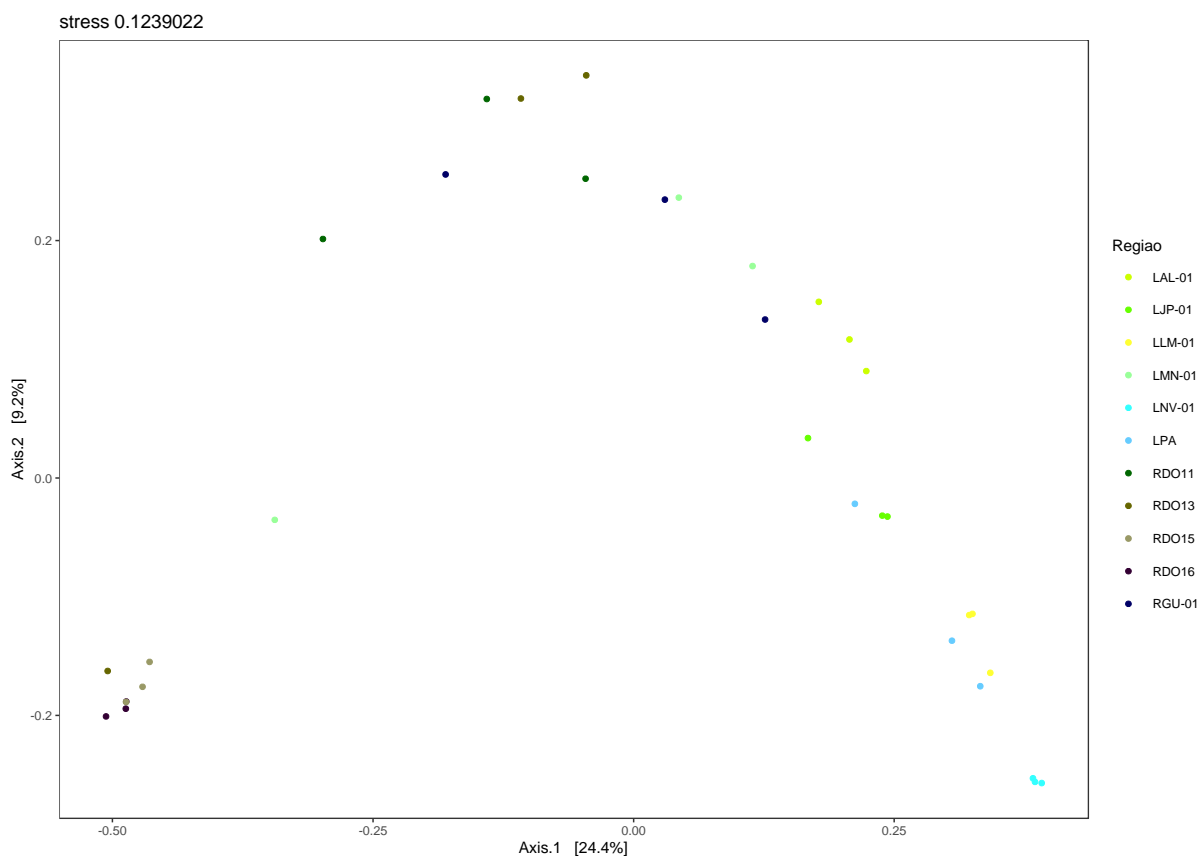
A ordenação gerada pela PCA, a partir dos resultados das análises das amostras de água superficial coletadas no ambiente dulcícola, confirmou a diferença entre as comunidades presentes nas amostras da calha principal do Rio Doce e nas amostras das Lagoas adjacentes.

Figura 23: Ordenação gerada por Análise de Componentes Principais (PCA) da comunidade microbiológica presente nas amostras de água de fundo coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16).



A ordenação gerada pela PCA, a partir dos resultados das análises das amostras de água de fundo coletadas no ambiente dulcícola, confirmou a diferença entre as comunidades presentes nas amostras da calha principal do Rio Doce e nas amostras das Lagoas adjacentes.

Figura 24: Ordenação gerada por Análise de Componentes Principais (PCA) da comunidade microbiológica presente nas amostras de sedimento coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Lago do Limão (LLM-01), Lago Nova (LNV-01), Lago Juparanã (LJP-01), Lago Palmas (LPA), Lagoa do Areal (LAL-01), Lagoa Monsarás (LMN-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13), Rio Doce em Linhares (RDO-15) e foz do Rio Doce (RDO-16).



A ordenação gerada pela PCA, a partir dos resultados das análises das amostras de sedimento coletadas no ambiente dulcícola, confirmou a diferença entre as comunidades presentes nas amostras da calha principal do Rio Doce e nas amostras das Lagoas adjacentes.

### 3.4 ÍNDICE DE TOXICIDADE

Tabela 6: Resultados dos ensaios de toxicidade realizados com amostras de água e sedimento coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022) do Projeto Ecotoxicologia do PMBA/Fest. Os resultados estão expressos como percentual da amostra-teste que causou toxicidade.

Ensaios de toxicidade aguda e crônica – água e sedimento do Rio Doce									
Ensaio	Campanha	RGU-01 água	RGU-01 sedimento	RDO-11 água	RDO-11 sedimento	RDO-13 água	RDO-13 sedimento	RDO-16 água	RDO-16 sedimento
<i>R. subcapitata</i> (ABNT NBR 12648)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%
		CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE
<i>C. dubia</i> (ABNT NBR 13373 - ensaio semicrônico)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: 6,25% CEO: 12,5%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: >100%	CENO: 25% CEO: 50%
		CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE
<i>D. magna</i> (ABNT NBR 12713 - ensaio agudo)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%
		CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: 42%	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE
<i>D. rerio</i> larva (ABNT NBR 15499)	Março de 2022	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE

**Ensaio de toxicidade aguda e crônica – água e sedimento do Rio Doce**

Ensaio	Campanha	RGU-01 água	RGU-01 sedimento	RDO-11 água	RDO-11 sedimento	RDO-13 água	RDO-13 sedimento	RDO-16 água	RDO-16 sedimento
<i>D. rerio</i> adulto (ABNT NBR 15088)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO:>100%
<i>Hyalella</i> spp (ABNT NBR 15470)	Março de 2022	NA	NT	NA	NT	NA	NT	NA	NT

Legenda: NE: não estimável (quando não foi possível calcular o valor de toxicidade, mas a análise se apresentou consistente); CL50: concentração mediana que causa 50% de inibição no crescimento ou reprodução dos indivíduos; CL50: concentração letal mediana para 50% dos indivíduos; CE50: concentração mediana que causa efeito em 50% dos indivíduos; CENO: concentração de efeito não observado; CEO: concentração de efeito observado; VCEST: valor crônico estimado ( $CL_{15} * 0,3$ , sendo que a  $CL_{15}$  corresponde a concentração letal mediana para 15% dos indivíduos); NA: não se aplica (quando o teste não é aplicável para a matriz); NT: não-tóxico; T: tóxico. Quando CENO for > 100, o valor de CEO não pode ser estimado, portanto, não é referenciado na Tabela. Para o ensaio crônico com *D. magna*, o valor de CEO representa redução estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) do número de neonatos dos organismos expostos à amostras-teste com relação ao controle (resultado relativo à reprodução). A classificação como tóxico no ensaio com *Hyalella* spp representa redução estatisticamente significativa na sobrevivência dos organismos ( $p > 0,05$ ); enquanto a classificação não-tóxico é atribuída quando não há diferença estatística, sempre em relação ao controle. O método estatístico usado para detectar diferenças significantes entre os grupos foi ANOVA de uma via com teste a posteriori de Dunnett's ( $p < 0,05$ ). Valores de CL50 foram estimados pelo software Trimmed Spearman Karber (TSK) e CL15 calculado no Graphpad.

Dos ensaios com sedimento, apenas o ensaio com *Hyalella* spp foi realizado com sedimento total, os demais foram realizados com elutriato, portanto, para *Hyalella* spp, o resultado está expresso como tóxico ou não-tóxico. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13) e foz do Rio Doce (RDO-16).

Tabela 7: Resultados dos ensaios de toxicidade realizados com amostras coletadas nos pontos RGU-01, RDO-11, RDO-13 e RDO-16 durante a Campanha 8 (set/out de 2022 - período seco) pelo Projeto Ecotoxicologia do PMBA/Fest.

**Ensaio de toxicidade aguda e crônica – água e sedimento do Rio Doce**

Ensaio	Campanha	RGU-01 água	RGU-01 sedimento	RDO-11 água	RDO-11 sedimento	RDO-13 água	RDO-13 sedimento	RDO-16 água	RDO-16 sedimento
<i>R. subcapitata</i>	Set/Out de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO:>100%	CENO:>100%



**Ensaio de toxicidade aguda e crônica – água e sedimento do Rio Doce**

Ensaio	Campanha	RGU-01 água	RGU-01 sedimento	RDO-11 água	RDO-11 sedimento	RDO-13 água	RDO-13 sedimento	RDO-16 água	RDO-16 sedimento
(ABNT NBR 12648/2018)		CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE
<i>C. 51úbia</i> (ABNT NBR 13373/2017 – ensaio semicrônico)	Set/Out de 2022	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: <6,25% CEO: 6,25%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: 12,5% CEO: 25%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: <6,25% CEO: 6,25%
		CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE
<i>D. similis</i> (ABNT NBR 12713/2022 – ensaio agudo)	Set/Out de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%
		CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE	CL50: NE
<i>D. rerio</i> larva (ABNT NBR 15499/2016)	Set/Out de 2022	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE	VCEST: NE
<i>D. rerio</i> adulto (ABNT NBR 15088/2022)	Set/Out de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO:>100%
<i>Hyalella</i> spp (ABNT NBR 15470/2021)	Set/Out de 2022	NA	NT	NA	NT	NA	NT	NA	NT

Legenda: NE: não estimável (quando não foi possível calcular o valor de toxicidade, mas a análise se apresentou consistente); CI50: concentração mediana que causa 50% de inibição no crescimento ou reprodução dos indivíduos; CL50: concentração letal mediana para 50% dos indivíduos; CE50: concentração mediana que causa efeito em 50% dos indivíduos; CENO: concentração de efeito não observado; CEO: concentração de efeito observado; VCEST: valor crônico estimado ( $CL_{15} * 0,3$ , sendo que a  $CL_{15}$  corresponde a concentração letal mediana para 15% dos indivíduos); NA: não se

aplica (quando o teste não é aplicável para a matriz); NT: não-tóxico; T: tóxico. Quando CENO for > 100, o valor de CEO não pode ser estimado, portanto, não é referenciado na Tabela. Para o ensaio semicrônico com *C. 52úbia*, o valor de CEO representa redução estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) do número de neonatos dos organismos expostos à amostras-teste com relação ao controle (resultado relativo à reprodução). A classificação como tóxico no ensaio com *Hyaella* spp representa redução estatisticamente significativa na sobrevivência dos organismos ( $p>0,05$ ); enquanto a classificação não-tóxico é atribuída quando não há diferença estatística, sempre em relação ao controle. O método estatístico usado para detectar diferenças significantes entre os grupos foi ANOVA de uma via com teste *a posteriori* de Dunnett's ( $p<0,05$ ). Valores de CL50 foram estimados pelo software Trimmed Spearman Karber (TSK) e CL15 calculado no Graphpad.

Dos ensaios com sedimento, apenas o ensaio com *Hyaella* spp foi realizado com sedimento total, os demais foram realizados com elutriato. Os resultados estão expressos como percentual da amostra-teste que causou toxicidade. Para *Hyaella* spp o resultado está expresso como tóxico ou não-tóxico.

Tabela 8: Resultados e classificação dos ensaios de toxicidade com organismos de diferentes níveis da cadeia trófica, realizados com amostras de água e sedimento coletadas na malha amostral dulcícola durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022) do Projeto Ecotoxicologia do PMBA/Fest. O valor de toxicidade foi calculado considerando a unidade tóxica (UT) e os índices baseados na severidade da resposta observada e sensibilidade dos organismos testados. Código dos pontos amostrais: Rio Guandu (RGU-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13) e foz do Rio Doce (RDO-16).

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
RGU-01/Chuvoso	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	0	1	3	0	LT	0	NT	2	LT
		<i>D. magna</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
	Sedi men	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	8	1	3	24	LT	5	LT		

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
		<i>D. magna</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				
RDO-11/Chuvoso	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	0	1	3	0	NT	0	NT	0	NT
		<i>D. magna</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
	Sediment	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	0	1	3	0	NT	0	NT	0	NT

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
		<i>D. magna</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				
RDO-13/Chuvoso	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	0	1	3	0	NT	0	NT	1	NT
		<i>D. magna</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
	Sedi ment	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	2	1	3	6	LT	1	NT		

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
		<i>D. magna</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	AT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	LT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				
RDO-16/Chuvoso	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	0	1	3	0	NT	0	NT	1	NT
		<i>D. magna</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
	Sedi ment	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	2	1	3	6	MT	1	NT		

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
		<i>D. magna</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				

Legenda: UT: unidade tóxica, NT: não tóxica, LT: levemente tóxica, MT: moderadamente tóxica, T: tóxica. (Fonte: Anexo 1, TR4).

Tabela 9: Resultados e classificação dos ensaios de toxicidade, com organismos de diferentes níveis da cadeia trófica, realizados com amostras de água e sedimento coletadas nos pontos RGU-01, RDO-11, RDO-13 e RDO-16 durante a Campanha 8 (set/out de 2022 - período seco) pelo Tema Ecotoxicologia do PMBA/Fest.. O valor de toxicidade foi calculado considerando-se a unidade tóxica (UT) e os índices baseados na severidade da resposta observada e sensibilidade do organismo testado.

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
RGU-01/Seco	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	2	1	3	6	LT	2	LT	6	LT
		<i>D. similis</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				



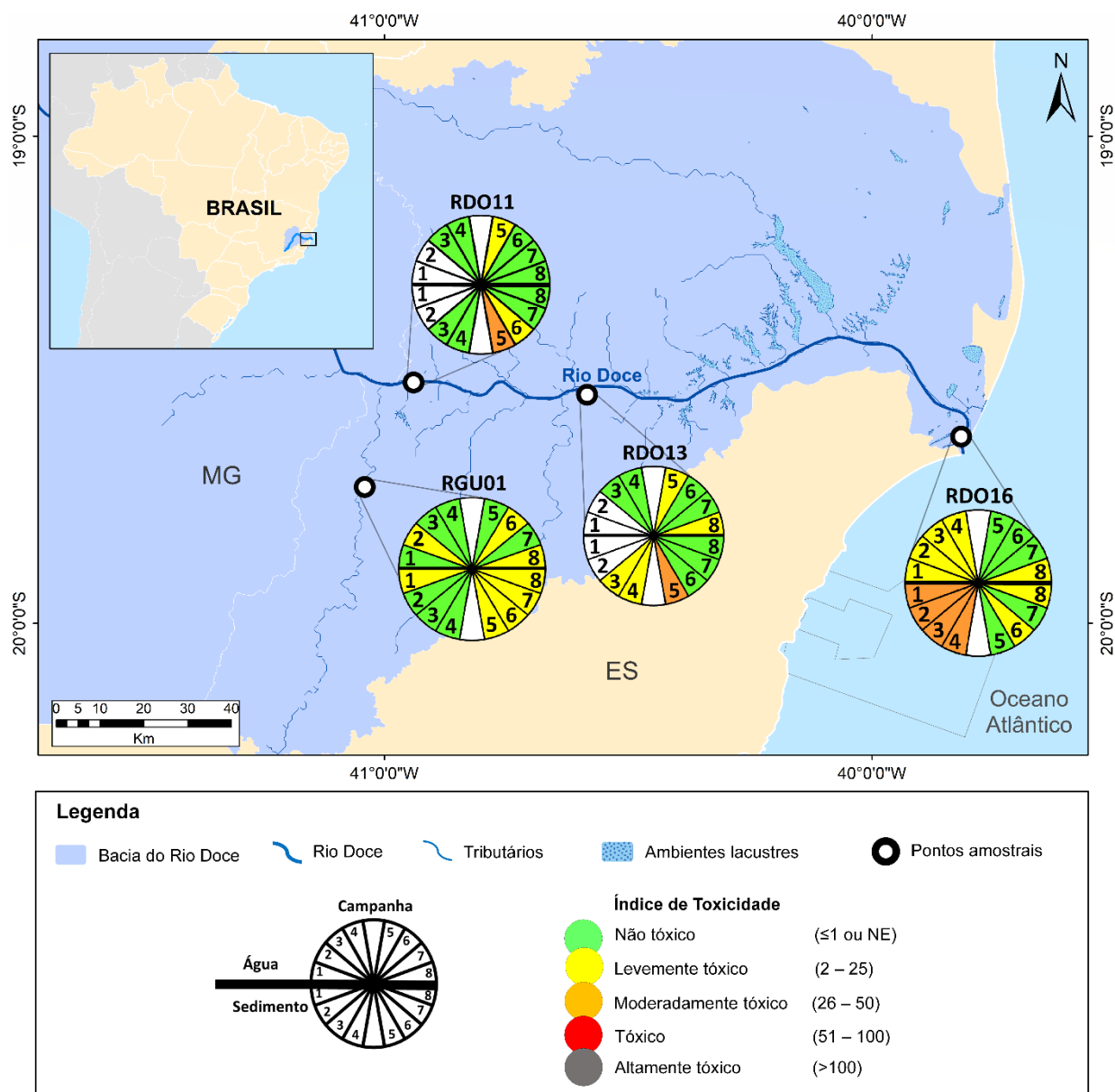
Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
	Sedimento	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	16	1	3	48	MT	10	LT		
		<i>D. similis</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				
		<i>Hyaella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				
RDO-11/Seco	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	1	1	3	3	LT	1	NT	1	NT
		<i>D. similis</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
RDO-11/Seco	Sedimento	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	1	1	3	3	LT	1	NT	1	NT
		<i>D. similis</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				
RDO-13/Seco	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	4	1	3	12	LT	3	LT	2	LT
		<i>D. similis</i> agudo	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
	Sedimento	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	2	1	3	6	LT	1	NT		
		<i>D. similis</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	AT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	LT				
RDO-13/Seco	Sedimento	<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT	1	NT	2	LT
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				
RDO-16/Seco	Água	<i>C. dubia</i> semicrônico	2	1	3	6	LT	2	LT	6	LT
		<i>D. similis</i> agudo	0	2	3	0	NT				

Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
		<i>D. rerio</i> crônico - larvas	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo	0	2	1	0	NT				
	Sedimento	<i>C. dubia</i> semicrônico (elutriato)	16	1	3	48	MT	10	LT		
		<i>D. similis</i> agudo (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> crônico – larvas (elutriato)	0	2	3	0	NT				
		<i>D. rerio</i> agudo (elutriato)	0	2	1	0	NT				
		<i>Hyalella</i> spp. (sedimento bruto)	-	-	-	0	NT				

Legenda: UT: unidade tóxica, NT: não tóxica, LT: levemente tóxica, MT: moderadamente tóxica, T: tóxica. (Fonte: Anexo 1, TR4).

Figura 25: Classificação ecotoxicológica das amostras de água e sedimento coletadas pelo PMBA/Fest durante a Campanha 1 (set/out 2018 - período seco), Campanha 2 (jan/fev 2019- período chuvoso), Campanha 3 (set/out 2019- período seco), Campanha 4 (jan/fev 2020 - período chuvoso), Campanha 5 (jan/fev 2021 - período chuvoso), Campanha 6 (jul/ago 2021 – período seco), Campanha 7 (mar/ 2022 – período chuvoso) e Campanha 8 (set/out 2022 – período seco). A sigla NE, na legenda da Figura, significa não estimável e é atribuída quando não se observa efeito da amostra bruta (100 %), impossibilitando estimar valor referente à concentração de efeito observado (CEO). O código dos pontos amostrais são: Rio Guandu (RGU-01), Rio Doce em Baixo Guandu (RDO-11), Rio Doce em Colatina (RDO-13) e foz do Rio Doce (RDO-16). Os pontos RDO-11 e RDO-13 passaram a ser monitorados a partir da Campanha 3.



Os ensaios de toxicidade, resumidos no Índice de Toxicidade, indicam aumento progressivo na toxicidade da água amostrada no afluente do Rio Doce (Rio Guandu: RGU-01), no Rio Doce em Colatina (RDO-13) e no ponto localizado no estuário (RDO-16). Para a matriz sedimento, foi observado um aumento na toxicidade durante a Campanha 8 (set/out 2022) no ponto amostral localizado no estuário (RDO-16). Porém, nos pontos amostrais no afluente do Rio Doce (Rio Guandu: RGU-01) e no Rio Doce em Colatina (RDO-13), não foi observada alteração na toxicidade, em relação àquela vista

na campanha anterior. Durante o período seco de 2022 (set/out 2022) foi observado um aumento na toxicidade no ponto amostral do Rio Doce, localizado no estuário (RDO-16), sendo as matrizes enquadradas na classificação “levemente tóxica”. Neste caso, os valores observados foram próximos àqueles vistos nos dois primeiros anos de monitoramento, que tiveram a água classificada como “levemente tóxica” e o sedimento classificado como “moderadamente tóxico”. Porém, cabe mencionar que ambos passaram a ser classificados como “não tóxicos” nos últimos dois anos. Vale lembrar que os anos de 2021 e 2022 foram marcados por chuvas intensas que podem ter apresentado uma certa contribuição na redução da carga tóxica do Rio Doce. Porém, nesse período amostrado (período seco), foi observado um aumento na toxicidade. Independentemente do ponto amostral, a maior toxicidade foi geralmente observada para o sedimento, em comparação com a água, à exceção do ponto amostral RDO-13, que apresentou maior toxicidade na água em comparação ao sedimento, durante o último período de amostragem. Estes resultados sugerem um efeito crônico dos elementos (metais e As) associados a esse compartimento ambiental.

#### 4 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todas as análises previstas foram realizadas, à exceção das análises das concentrações de As e metais nas amostras de água, sedimento e músculo de pescado (camarões e peixes) coletadas na Campanha 7 (ma 2022 – período chuvoso) e na Campanha 8 (set/out 2022 – período seco), bem como nas demais amostras biológicas coletadas na Campanha 8. A condução das análises das amostras de água, sedimento e músculo de pescado (camarões e peixes) coletadas na Campanha 7, bem como das demais amostras biológicas coletadas na Campanha 8 ainda aguarda uma definição por parte da Fundação Renova. Por sua vez, as amostras de água, sedimento e músculo de pescado (camarões e peixes) coletadas na Campanha 8 serão encaminhadas para análise das concentrações de As e metais em laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova. Por sua vez, os resultados das análises de biomarcadores e diversidade microbiana nas amostras coletadas na Campanha 8 (set/out 2022 – período seco) ainda não se encontram disponíveis em sua totalidade, tendo em vista que a realização das análises destas amostras foi autorizada pela Fundação Renova somente em fevereiro de 2023.

#### 5 REFERÊNCIAS

AEBI, H. **Catalase *in vitro***. In: Methods in enzymology. Academic Press, p. 121-126. 1984.

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. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, 22(1): 25-34. 1999.

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. **Process biochemistry**, 17(2): 45-47. 1982.

CHILDRESS, J. J., SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, 52: 273-283. 1979.

HENRY R. P. **Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: theelectrometric 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. 1991.

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. 2006.

MARKLUND, S., MARKLUND, G. 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. 1974.

NADELLA, S. R., FITZPATRICK, J.L., FRANKLIN, N., BUCKING, C., SMITH, S., WOOD, C. M. 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. .2009

PÉQUEUX, A., CHAPELLE, S. 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. 1982.

RIBEIRO, A. C., BATISTA, M. T. O., RODRIGUES JR, E., DE OLIVEIRA, M. F., VANI, G. S., RODRIGUES, E., SUDA, C. N. K. 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. 2015.

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