

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

Material Suplementar Ambiente Marinho – Tema Ecotoxicologia

RT- 43/ JUN 23

RA2022 PMBA/Fest

Vitória,

Junho de 2023

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	3
2	METODOLOGIA	3
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
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	23
3.1	ÍNDICE DE BIOACUMULAÇÃO (<i>IBR BIOACUMULAÇÃO</i>)	24
3.2	ÍNDICE DE RESPOSTA BIOLÓGICA (<i>IBR BIOMARCADOR</i>)	35
3.3	DIVERSIDADE MICROBIANA	47
3.4	ÍNDICE DE TOXICIDADE	56
4	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	67
5	REFERÊNCIAS	67

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 neste relatório contempla o escopo de amostragens e análises vigentes entre setembro de 2018 e setembro de 2022, referentes ao Plano de Trabalho de 2018, do início do monitoramento. Especificamente para o tema Ecotoxicologia, o mesmo não abarca o período denominado “Novo Ciclo”, pois este tema teve sua Proposta Técnica de continuidade do monitoramento aprovada e implementada somente em janeiro de 2023.

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/Fest (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 12345678”* 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 com a especificação de congelamento, foram mantidas congeladas.
- (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 (mar 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 Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} e 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 caso dos pontos amostrais localizados na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, sempre que possível, foram coletados os seguintes organismos: fitoplâncton (coleta com rede de fitoplâncton); zooplâncton (coleta com rede de zooplâncton); macrocrustáceos (coleta com rede de arrasto ou armadilha); peixes (coleta com rede de arrasto, rede de emalhar ou outra arte de pesca). As espécies de macrocrustáceos incluíram o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis* ou *F. brasiliensis*) e o camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*). Por sua vez, as espécies de peixes previstas incluíram o roncador *Conodon nobilis*, a pescadinha *Cynoscion sp.*, o peroá *Balistes capriscus* e o linguado sem mancha *Paralichthys sp.* Todavia, diante da impossibilidade de coleta destas espécies de peixes, originalmente previstas, em todos os pontos amostrais e/ou em número amostral mínimo necessário para as análises de bioacumulação e respostas de biomarcadores, as mesmas foram substituídas por outras que haviam sido coletadas e analisadas nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (jan 2016 – fev 2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. A lista de espécies coletadas durante a Campanha 7 (mar 2022 – estação chuvosa) está descrita na Tabela 1, enquanto as espécies coletadas durante a Campanha 8 (set/out 2022 – estação seca) encontram-se listadas na Tabela 2.

Exemplares de poliquetas e moluscos não foram coletados, devido a dificuldades metodológicas enfrentadas durante as campanhas, haja vista que os invertebrados bentônicos de fundo inconsolidado das localidades estudadas são pequenos e requerem, portanto, uma triagem minuciosa do sedimento com o uso de lupa. As condições na embarcação, logística relacionada ao volume do sedimento a ser triado; a biomassa mínima necessária de cada grupo (poliqueta, moluscos, etc.) para análise de metais/As e biomarcadores; além do fato de que essa triagem deve ser conduzida de forma muito rápida e controlada, com troca de água do local e controle de luz e temperatura para evitar alterações nos biomarcadores bioquímicos; são fatores que inviabilizaram a coleta de invertebrados bentônicos concomitantemente com as demais atividades diárias previstas e nas condições de logística

disponíveis. Cabe mencionar que estes organismos já não haviam sido obtidos com biomassa e condições adequadas para análise de biomarcadores nas expedições anteriores ao PMBA/Fest.

Para a região de Abrolhos, especificamente, foram coletados corais da espécie *Mussismilia hartii* e hidrocorais da espécie *Millepora alcicornis*, de forma manual por mergulho.

Tabela 1: Espécies de peixes (nome científico e/ou nome popular e número de indivíduos) coletados no ambiente marinho durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022).

Ponto amostral	Espécie	Hábito		Total
		Carnívoro	Onívoro	
BN1		6	11	17
	Peixe 10 - Palombeta		6	6
	Peixe 17 - Sardinha		5	5
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
CA1		16		16
	Peixe 18 - Corvina	2		2
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	5		5
	Peixe 7 - Michole	3		3
CA3		6		6
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
DEG1		12	10	22
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	5		5
	Peixe 10 - Palombeta		5	5
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
	Peixe 32 - <i>Lutjanos</i>	1		1
	Peixe 34 - Papa Terra		2	2
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		3	3
DEG2		7	9	16
	Peixe 10 - Palombeta		1	1
	Peixe 12 - Carapicu (carapeba)		1	1
	Peixe 19 - Trilha		5	5
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
	Peixe 34 - Papa Terra		2	2
	Peixe 7 - Michole	1		1
FRD1		12	11	23
	Peixe 11 - Bagre	5		5
	Peixe 18 - Corvina	2		2
	Peixe 33 - Maria Luíza Rosa		5	5
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	5		5
	Peixe 5 - Maria Luíza		3	3
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		3	3
FRD10		7	14	21
	Peixe 18 - Corvina	1		1
	Peixe 34 - Papa Terra		2	2
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	6		6
	Peixe 5 - Maria Luíza		6	6
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	6
FRD3		17	7	24
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		6

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
FRD6	Peixe 17 - Sardinha		4	4
	Peixe 18 - Corvina	1		1
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	4		4
	Peixe 5 - Maria Luíza		3	3
		15	8	23
FRD8	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		6
	Peixe 11 - Bagre	6		6
	Peixe 33 - Maria Luiza Rosa		4	4
	Peixe 34 - Papa Terra		2	2
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	3		3
	Peixe 5 - Maria Luíza		2	2
FRD9		21	3	24
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		6
	Peixe 18 - Corvina	3		3
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	6		6
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		3	3
ITA1		5	18	23
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	3		3
	Peixe 33 - Maria Luiza Rosa		6	6
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	2		2
	Peixe 5 - Maria Luíza		6	6
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	6
VIX2		16	7	23
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		6
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		6
	Peixe 5 - Maria Luíza		1	1
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	6
	Peixe 7 - Michole	4		4
		4	2	6
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	1		1
	Peixe 13 - Cocorota	1		1
	Peixe 3 - Peroá - <i>Balistes capriscus</i>	2		2
	Peixe 34 - Papa Terra		1	1
	Peixe 36 - Xerelete		1	1
Total		144	100	244

Tabela 2: Espécies de peixes (nome científico e/ou nome popular e número de indivíduos) coletados no ambiente marinho durante a Campanha 8 (período seco, set/out 2022).

Ponto amostral	Espécie	Hábito		Total
		Carnívoro	Onívoro	
BN1				23
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 5 - Maria Luíza		6	
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	5		
CA1				24
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 18 - Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	2		
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	4		
	Peixe 5 - Maria Luíza		5	
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	1		
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		
DEG1				20
	Peixe 5 - Maria Luíza		6	
	Peixe 18 - Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	2		
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		
DEG2				22
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 18 - Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	4		
	Peixe 19 - Trilha (Mullidae)		6	
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		
FRD1				18
	Peixe 11 - Bagre	6		
	Peixe 34 - Papa Terra		2	
	Peixe 33 - Maria Luíza Rosa		2	
	Peixe 36 - Xerelete	1		
	Peixe 5 - Maria Luíza		3	
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		4	
FRD10				23
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 33 - Maria Luíza Rosa		4	
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	3		
	Peixe 5 - Maria Luíza		4	
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		
FRD3				24
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 19 - Trilha		6	

Ponto amostral	Espécie	Hábito		
		Carnívoro	Onívoro	Total
FRD6	Peixe 18 - Corvina	3		
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	3		
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		
				24
FRD8	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 36 - Xerelete	6		
	Peixe 19 - Trilha		6	
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		
				24
FRD9	Peixe 36 - Xerelete	6		
	Peixe 7 - Michole	6		
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		
	Peixe 19 - Trilha		6	
				24
ITA1	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 33 - Maria Luiza Rosa		6	
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	6		
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		
				23
VIX1	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	5		
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	6		
	Peixe 5 - Maria Luíza		6	
	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
				15
VIX2	Peixe 6 - Cabeção / Cabeça dura		6	
	Peixe 4 - Pescadinha - <i>Cynoscion sp.</i>	3		
	Peixe 1 - Roncador - <i>Conodon nobilis</i>	6		
				18
	Peixe 12 - Carapicu (carapeba)		6	
	Peixe 27 - Voador	6		
	Peixe 2 - Linguado - <i>Paralichthys spp.</i>	6		
Total				282

A coleta de amostras para as análises de metais e As nos organismos da foz do Rio Doce e região marinha adjacente, em cada ponto do monitoramento, foi realizada considerando-se: a decisão da Câmara Técnica de Biodiversidade (Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio) em adotar um número reduzido de exemplares de crustáceos e peixes dulcícolas e estuarinos para as análises das concentrações de metais/As e dos biomarcadores; a necessidade, para fins de análise e modelagem estatística, de balanceamento entre o número de amostras a serem analisadas nos diferentes ambientes (dulcícolas, estuarinos, marinhos, praias e manguezais); a viabilidade de aplicação de

modelos estatísticos empregados em ecotoxicologia; bem como, os resultados positivos obtidos com o número amostral utilizado anteriormente nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (jan 2016 – fev 2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Sendo assim, foram adotados os seguintes números amostrais: fitoplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída por pools de, no mínimo, 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); zooplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída por pools de, no mínimo, 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); hidrocorais (6 fragmentos de *Millepora alcicornis* por ponto de coleta); corais (6 fragmentos de *Mussismilia harttii* por ponto de coleta); macrocrustáceos (6 indivíduos por ponto de coleta e por espécie); peixes (6 indivíduos por ponto de coleta e por espécie, quando possível). Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais e As nos organismos marinhos, conforme descrito acima, foi também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Após a biometria, os crustáceos foram adequadamente anestesiados. Logo após, foi coletada a hemolinfa de cada indivíduo e o organismo foi dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. Por sua vez, os peixes, que também foram adequadamente anestesiados, tiveram seu sangue coletado e, após eutanásia, foram dissecados para coleta de músculo, brânquias e fígado.

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 As, bem como para a determinação da composição iônica, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas até o laboratório, onde foram devidamente armazenadas sob congelamento. A sequência dos procedimentos realizados encontra-se descrita abaixo em maiores detalhes.

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 [C₆H₁₂O₆]; 94 mM Citrato de Sódio [Na₃C₆H₅O₇.H₂O]; 26 mM Ácido Cítrico [C₆H₈O₇]; 7,85 mM EDTA dissódico [C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O]; pH 4,6). Em todos os casos, os materiais utilizados, tais como a seringa e o anticoagulante, foram mantidos gelados, a fim de evitar a coagulação da hemolinfa. Para a coleta de hemolinfa em camarões, a seringa foi inserida na membrana entre a região dorsal do cefalotórax e abdômen, tomando-se o cuidado para não coletar a água da cavidade branquial. O sobrenadante (plasma) obtido a partir de centrifugação (Minicentrífuga Mylabor; 1 min; velocidade fixa de 4.656 g) foi transferido para um criotubo de 2 mL e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido. Após a centrifugação da hemolinfa e separação do plasma, o pellet foi armazenado em criotubos de 2 mL (n = 6) em nitrogênio líquido para posterior análise de Sítios AP (danos no DNA) em laboratório. Para a coleta de tecidos de camarões, as brânquias foram cuidadosamente dissecadas com o auxílio de microtesoura. O tecido branquial de cada indivíduo foi destinado para a análise das concentrações de As e metais (n = 6), análise de lipoperoxidação (n = 6) e atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (n = 6). 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 uma 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.

Após a captura, os peixes foram identificados, pesados (g) e medidos (mm). Para as análises das concentrações de As e 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 15 μ L do sangue de cada animal foi dispensada em três lâminas de vidro, limpas e devidamente identificadas, para a confecção de esfregaços sanguíneos e posterior análise de danos no DNA (Teste do Micronúcleo). As lâminas permaneceram secando durante a noite, em caixas próprias protegidas da luz e calor, e então fixadas em metanol absoluto por 10 min. O restante do sangue total foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de danos oxidativos no DNA, com base na quantificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP). Para a determinação das concentrações iônicas plasmáticas e biomarcadores de desregulação endócrina (vitelogenina e proteína da zona radiata), outras 6 amostras de sangue total foram retiradas do grupo de peixes destinados à análise das concentrações de As e metais ($n = 6$). Logo após a coleta, 5 μ L de um coquetel inibidor de proteases (Sigma Aldrich®) foram adicionados a cada 100 μ L de amostra. Estas foram então 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).

Todas as amostras biológicas destinadas às análises de As e metais foram acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Estas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e seguiram para o transporte até o laboratório, onde foram mantidas congeladas em freezer comum (-20°C) até o momento das análises. Nestas amostras, serão analisados os seguintes elementos: Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni) e Zinco (Zn). Da mesma forma, as amostras dos organismos coletados para as análises de biomarcadores foram acondicionadas em tubos criogênicos e congeladas (nitrogênio líquido) em campo. As amostras congeladas foram transportadas para o laboratório, onde foram mantidas congeladas em ultrafreezer (-80°C). Foram realizadas as análises dos biomarcadores em tecidos específicos dos organismos, considerando-se a natureza de cada biomarcador, conforme detalhado mais adiante.

2.2 ANÁLISES DE LABORATÓRIO

Avaliação da microbiota em água, sedimento e corais

Para o monitoramento da comunidade microbiana total, foram coletadas, em triplicata, amostras de água, sedimento e fragmentos de corais, em cada ponto de coleta. As coletas para a avaliação microbiológica foram realizadas nos 25 pontos de amostragem na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Por sua vez, as amostras de corais foram coletadas nos 4 pontos de monitoramento na região de Abrolhos, incluindo um recife-controle (ABRC1), fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos. A análise da microbiota total em amostras de água, sedimento e fragmentos de corais foi realizada 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 àquelas 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 àquelas descritas abaixo, para a determinação dos respectivos biomarcadores.

Quadro 1: Lista dos biomarcadores analisados em amostras de organismos coletados pelo Tema Ecotoxicologia na foz do Rio Doce e região marinha adjacente.

Amostra biológica	Biomarcador (classificação: efeito/exposição)
Fitoplâncton	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Zooplâncton	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Composição iônica corporal (efeito)
Hemolinfa de camarões	Danos de DNA (efeito)
Brânquias de camarões	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 endócrino: vitelogenina e proteína da zona radiata (efeito)
Brânquias de peixes	Atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase e catalase (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético: lactato desidrogenase e malato desidrogenase (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Fígado de peixes	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase e catalase (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético: lactato desidrogenase e malato desidrogenase (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Músculo de camarões e peixes	Oxidação de proteínas (efeito)
Corais e hidrocorais	Peroxidação lipídica (efeito) Atividade de enzimas envolvidas na calcificação: CaATPase, MgATPase e anidrase carbônica (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 µg MT/mg proteína.

O preparo de amostras de fragmentos de coral para análise dos parâmetros de calcificação foi realizado macerando-se as amostras em nitrogênio líquido. Para cada análise, as amostras foram homogeneizadas em tampão específico (1:1; peso/volume) com o auxílio de um sonificador. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante coletado para as análises das atividades das enzimas Ca^{2+} -ATPase, Mg^{2+} -ATPase e anidrase carbônica. A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas foi realizada, utilizando-se o método de Bradford.

A determinação da atividade da anidrase carbônica (AC) foi realizada medindo-se a redução de pH associada à catálise da hidratação do CO_2 , com a correspondente liberação de H^+ (Henry, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras foi constituído de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritiotreitól (DTT 1 mM). Para isso, 15 μL do homogeneizado foram adicionados a 3 mL de uma solução de reação composta por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). Em seguida, foram adicionados 280 μL de substrato (água destilada saturada com CO_2) e o decréscimo de pH registrado a cada 5 s, durante 30 s, com o auxílio de um pHmetro de bancada. Paralelamente foram realizadas determinações do "branco de reação", onde 15 μL do tampão de homogeneização foi adicionado à solução de reação e ao substrato. Utilizou-se o modelo de regressão linear (variável dependente: pH; variável independente: tempo) para determinar a declividade das retas de reação e os resultados foram normalizados considerando-se a quantidade de proteínas nas amostras e expressos em Unidades de anidrase carbônica/mg proteína.

A determinação das atividades da Ca^{2+} -ATPase e da Mg^{2+} -ATPase foi realizada utilizando-se o método descrito por Vajreswari et al. (1983), com modificações. O homogeneizado da amostra foi preparado utilizando-se tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado foi centrifugado (20 min, 10.000 g, 4°C) e 20 μL do sobrenadante foi utilizado para as análises. O meio de reação utilizado na análise da atividade da Ca^{2+} -ATPase foi composto por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), CaCl_2 (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação ocorreu a 30°C por 30 min. Por sua vez, o meio de reação utilizado na análise da atividade da Mg^{2+} -ATPase foi composto por NaCl (189 mM), MgCl_2 (5 mM), EGTA (0.2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação foi realizada a 30°C por 30 min. No início da incubação, ATP (3 mM) e ouabaína (1mM) foram adicionados aos meios de reação. Determinou-se a concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação utilizando-se o método colorimétrico (630 nm). Os resultados foram normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e expressos em mM Pi /mg proteína/minuto.

Para a determinação da composição iônica corporal, as amostras de zooplâncton apanhadas foram rapidamente (30 s) lavados em água tipo MilliQ e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente o material foi seco em estufa (70°C), por 96 h, e determinou-se o peso seco do material e em seguida as amostras foram digeridas em ácido nítrico 65% (SupraPur®, Merck). Após completa digestão, as amostras foram apropriadamente diluídas para a análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), a qual foi determinada por acordo com metodologia EPA 6020A, utilizando-se espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Analytic Jena). 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 Láctica LDH UV® (Bioclin). Para a determinação da atividade da MDH foram adicionados aos sobrenadantes dos homogeneizados uma solução contendo ácido oxaloacético (0,4 mM), MgCl₂ (20 mM), NADH (150 µM) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas são aqueles descritos pelo fabricante Bioclin e Childress e Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, e adaptada por Ribeiro et al. (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas foi determinada por espectrofotometria UV à 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados foi realizada através do método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Enzimáticas/mg de proteína.

As atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) foram determinadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no parágrafo acima. A atividade da CAT foi determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conforme descrito por Aebi (1984). Por sua vez, a atividade da SOD foi medida através da taxa de inibição da auto-oxidação do 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/10⁵ pares de bases (bp).

Para a avaliação do dano no material genético através do teste de micronúcleo (MN), foram utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes. 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 (Na₂HPO₄; KH₂PO₄), também por 20 min. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas com água deionizada, secas ao ar e montadas com lamínulas e Entellan® (Merck). Posteriormente, 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 1000 células em cada lâmina, sendo, então, quantificado o número de células micronucleadas por 1000 células analisadas (frequência em %). Cabe ressaltar que, devido às dificuldades metodológicas enfrentadas no campo, durante o processamento das lâminas de hemolinfa, as mesmas não puderam ser devidamente analisadas, visto o reduzido número de hemócitos e a baixa integridade estrutural destas células, o que inviabilizou a apresentação do resultado de MN para as espécies de crustáceos coletadas 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

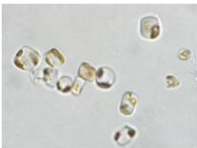



Ensaios ecotoxicológicos foram realizados para classificar amostras de água e sedimento, coletadas na região marinha adjacente ao Rio Doce, quanto às suas toxicidades. Os pontos de amostragem estão apresentados no Quadro 2. Cabe ressaltar que, a partir do Período de Transição, um ponto de coleta em Degredo (DEG1) foi incluído no monitoramento. As amostras de água, elutriado de sedimento e sedimento total foram coletadas, armazenadas e preparadas segundo a norma da ABNT NBR 15469 visando a realização dos testes de toxicidade descritos na Tabela 3. Cabe destacar que os testes com as amostras de água e elutriado coletadas na Campanha 7 (mar 2022) e Campanha 8 (jul/ago 2022), utilizando o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (crônico - ABNT NBR 15350), foram realizadas por laboratório acreditado (Aplysia), por determinação da Fundação Renova. Para os ensaios com amostras de sedimento total, a empresa Aplysia realizou o teste com o copépode *Nitokra* sp (Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil, 2002), por determinação da Fundação Renova. No laboratório de microalgas do Instituto de Ciências Biológicas da FURG, foi realizado o teste com as microalgas da espécie *Thalassiosira pseudonana* (ABNT NBR 16181). No laboratório de Toxicologia do Instituto de Biociências da FURG, foi realizado o teste com o peixe *Poecilia vivipara* (OECD 203). Já no laboratório de Ecotoxicologia, localizado na Base Oceanográfica da UFES, em Coqueiral de Aracruz, foi realizado o teste agudo com água e elutriado utilizando o ouriço-do-mar *Echinometra*

lucunter (agudo - Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil, 2002). 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 a altamente tóxicas (Tabela 4). Vale lembrar que, para cada ponto amostral, esta classificação foi feita separadamente para água e sedimento, e levou em consideração a média dos valores de toxicidade resultantes dos diferentes ensaios realizados com as matrizes ambientais.

Quadro 2: Pontos amostrais na foz do Rio Doce e região marinha adjacente onde foram coletadas amostras de água e sedimento usados para os testes de toxicidade realizados no Ano 1 (campanha 1 – set/out 2018 e campanha 2 – jan/fev 2019) e Anos 2, 3 e 4 (campanha 3 – set/out 2019, campanha 4 – jan/fev 2020, campanha 5 – jan/fev 2021, campanha 6 – jul/ago, campanha 7 – mar/ 2022 e campanha 8 – set/out 2022). O ponto CA2 não foi amostrado na campanha 3 (set/out 2019).

AMBIENTE	ANO 1	ANOS 2, 3 3 4	ALTERAÇÃO DE MALHA AMOSTRAL
Marinho	FRD1 FRD6 CA1 CA2	FRD1 FRD6 CA1 CA2 DEG1	Inclusão da estação DEG1

Tabela 3: Resumo dos ensaios de toxicidade realizados com amostras coletadas na malha amostral marinha do Tema Ecotoxicologia do PMBA/Fest.

Informação	Microalga	Crustáceo	Ouriço-do-mar	Peixe
Espécie	 <i>Thalassiosira pseudonana</i> ¹	 <i>Nitokra</i> sp (copépode) ²	 <i>Echinometra lucunter</i> ³	 <i>Poecilia vivipara</i> ⁴
Procedência do organismo	Banco de Microrganismos Aidar & Kutner – BMAK 172 – IO/USP	Cultivo da Empresa Aplysia	Ambiente Natural – Coqueiral/ES (Ensaio agudo) Ambiente Natural – Jacaraípe/ES (Ensaio crônico)	Biotério Aquático do ICB/FURG
Matriz	Água Superficial/Elutriato de Sedimento	Sedimento Bruto	Água Superficial/Elutriato de Sedimento	Água Superficial/Elutriato de Sedimento
Tipo do teste	Crônico	Crônico	Agudo/Crônico	Agudo
Método	ABNT NBR 16181	Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil	Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil/ ABNT NBR 15350	OECD 203
Duração	72 h	10 dias	2 h/48 h	96 h
Indicador de toxicidade	Inibição da multiplicação das algáceas	Número de fêmeas/prole	Óvulos fecundados/Larvas desenvolvidas	Mortalidade

Legenda: ¹ <https://ncma.bigelow.org/ccmp1014#.XW5t-yMrK1t>; ² http://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=683171; ³ Acervo do projeto; ⁴ <http://museunacional.ufrj.br/hortobotanico/Peixes/Poeciliavivipara.html>

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, ovos e larvas de ouriços e larvas de peixes)	3
Peixe juvenil	2
Peixe adulto	1

Tabela 4: Classificação da amostra em 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 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 metodológicas nos ensaios de toxicidade. Como mencionado anteriormente, a partir do Período de Transição, o ponto em Degredo (DEG1) foi incluído no monitoramento. Cabe destacar também que, na Campanha 7 (março de 2022) e na Campanha 8 (jul/ago de 2022), a empresa Aplysia (laboratório acreditado) passou a realizar os seguintes ensaios toxicológicos: testes com água e elutriato, utilizando o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (crônico - ABNT NBR 15350) e teste com sedimento total utilizando o copépode *Nitokra* sp (Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil, 2002).

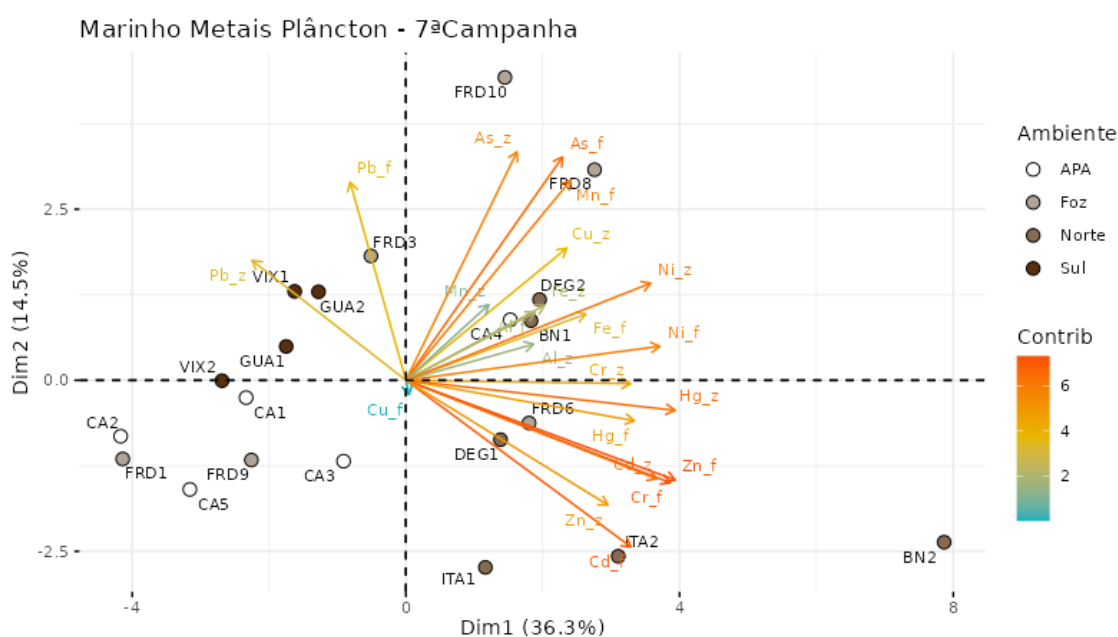
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest e obtidos ao longo do monitoramento (setembro/2018 – setembro/2022) na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretação e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte a gestores ambientais. A partir destes indicadores, pode-se identificar os impactos com relação direta ou indireta ao rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG).

Os indicadores do PMBA/Fest vêm se consolidando ao longo de quatro anos de monitoramento, onde seus principais resultados foram discutidos em todos os relatórios técnicos entregues até o presente, 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 será 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 dos elementos Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) nas amostras de plâncton [fito (_f) e zooplâncton (_z)] coletadas durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 36,6% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 14,5% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 50,8% 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 na comunidade planctônica marinha. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. A ordenação gerada pela PCA mostrou que as concentrações da maioria dos elementos analisados no plâncton coletado no período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar/ 2022) estiveram associadas aos pontos amostrais localizados mais ao norte da foz do Rio Doce (FRD8 e FRD10), bem como naqueles de Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA).

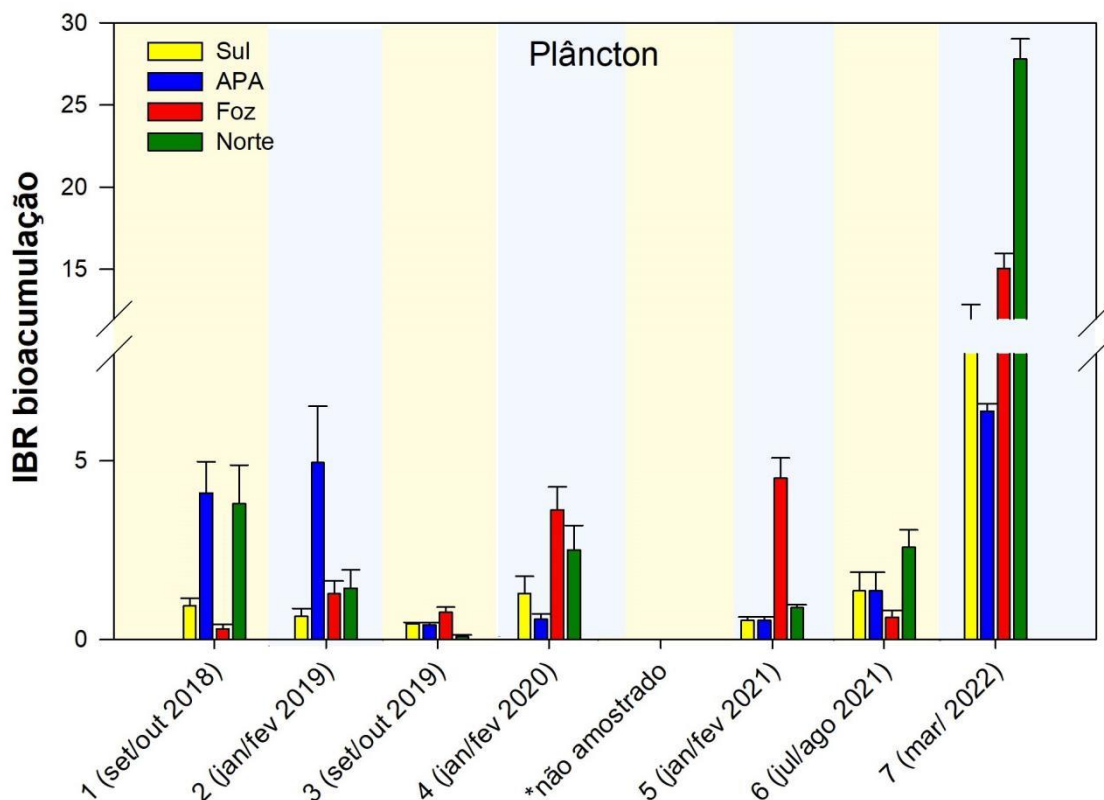
Tabela 5: Concentração média de metais (mg.Kg-1) em amostras de zooplâncton coletadas nos diferentes setores do ambiente dulcícola (Afluente, Rio, Lagos e Lagoas) durante a Campanha 1 (set/out 2018 – período seco), Campanha 2 (jan/fev 2019 – período chuvoso), Campanha 3 (set/out 2019 – período seco), 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) pelo 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.

Fonte de Dados	Período de coleta	Localidades	Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	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	0.0008	6.6840	0.0053
Dados PMBA - Fest	Campanha 1 (set/out 2018)	Abrolhos (ABR)	Zooplâncton	0.0293	0.3001	0.1412	0.2837	24.0601	0.0033	0.8459	0.0353
		Barra Nova (BN)		0.2707	3.1809	1.7613	6.3256	16.7315	0.0112	10.3712	0.1678
		Costa das Algas (CA)		0.2777	0.1828	0.9206	2.3251	68.6556	0.0034	17.1791	2.3645
		Degredo (DEG)		0.2236	0.0999	0.1630	1.2556	7.9255	0.0045	1.3114	0.0410
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.0411	0.0663	0.6648	2.0937	44.0699	0.0030	2.8374	0.0809
		Guarapari (GUA)		0.0610	0.0798	0.4149	0.5496	3.0506	0.0030	2.2415	0.6165
		Itaúnas (ITA)		0.1388	0.3170	0.8096	1.2959	5.1272	0.0030	2.3340	0.1721
		Vitória (VIX)		0.0947	0.1207	0.4935	0.8738	94.5257	0.0032	4.1559	0.7407
	Campanha 2 (jan/fev 2019)	Abrolhos (ABR)	Zooplâncton	0.028	0.026	0.138	0.283	20.366	0.003	1.968	0.171
		Barra Nova (BN)		0.201	0.014	4.749	0.155	46.362	0.003	9.556	0.806
		Costa das Algas (CA)		0.086	1.340	0.209	1.661	176.630	0.003	2.848	0.005
		Degredo (DEG)		0.142	0.014	1.678	1.452	11.819	0.003	1.658	0.444
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.245	0.548	0.316	0.637	220.278	0.003	2.934	0.026
		Guarapari (GUA)		0.009	1.092	0.051	0.216	56.573	0.003	1.249	0.012
		Itaúnas (ITA)		0.024	0.078	0.088	0.144	8.651	0.003	1.106	0.016
		Vitória (VIX)		0.005	1.285	0.100	0.579	49.525	0.003	0.938	0.005

Fonte de Dados	Período de coleta	Localidades	Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb
	Campanha 3 (set/out 2019)	Abrolhos (ABR)	Zooplâncton	0.167	0.176	0.115	0.054	26.612	0.012	0.837	0.095
		Barra Nova (BN)		0.090	0.118	0.085	0.068	20.426	0.012	1.173	0.026
		Costa das Algas (CA)		0.098	0.409	0.374	0.051	13.086	0.016	1.462	0.008
		Degredo (DEG)		0.246	0.359	0.197	0.050	12.103	0.009	3.013	0.022
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.122	0.323	0.296	0.173	220.738	0.009	5.090	0.013
		Guarapari (GUA)		0.036	0.455	0.066	0.214	39.189	0.003	0.580	0.016
		Itaúnas (ITA)		0.083	0.039	0.034	0.051	6.574	0.010	0.490	0.018
		Vitória (VIX)		0.155	0.402	0.185	0.069	37.827	0.012	1.244	0.012
	Campanha 4 (jan/fev 2020)	Abrolhos (ABR)	Zooplâncton	0.535	0.106	0.447	2.650	3.203	0.005	4.167	0.231
		Barra Nova (BN)		0.043	0.117	0.184	0.235	288.067	0.004	10.765	0.089
		Costa das Algas (CA)		0.017	0.137	0.429	0.404	153.356	0.004	1.762	0.103
		Degredo (DEG)		0.075	0.134	0.095	2.164	243.702	0.004	4.501	0.018
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.180	0.058	1.179	1.216	182.275	0.005	2.911	0.097
		Guarapari (GUA)		0.504	0.080	0.830	1.087	90.627	0.004	1.034	0.158
		Itaúnas (ITA)		0.013	0.293	0.864	1.008	326.764	0.006	4.460	0.245
		Vitória (VIX)		0.042	0.013	0.093	0.378	137.760	0.003	1.729	0.063
	Campanha 5 (jan/fev 2021)	Abrolhos (ABR)	Zooplâncton	0.044	0.069	0.077	0.721	69.851	0.005	4.019	0.075
		Barra Nova (BN)		0.018	0.224	0.043	0.552	185.540	0.006	3.425	0.302
		Costa das Algas (CA)		0.051	0.231	0.316	1.174	204.394	0.008	3.838	0.210
		Degredo (DEG)		0.296	0.260	0.989	8.064	293.725	0.021	6.705	0.255
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.586	0.119	1.231	2.164	134.536	0.007	1.673	0.527
		Guarapari (GUA)		0.054	0.060	0.047	0.168	140.564	0.005	1.907	0.071

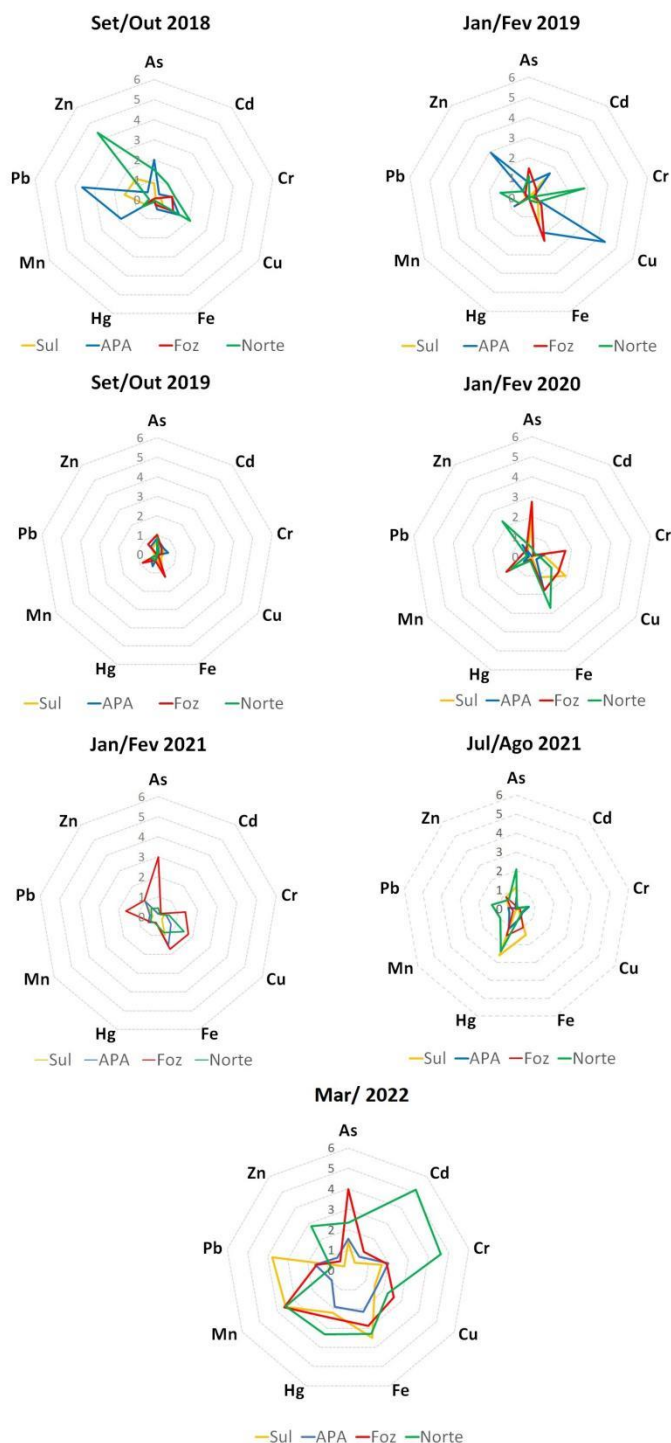
Fonte de Dados	Período de coleta	Localidades	Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb
		Itaúnas (ITA)		0.024	0.066	0.352	0.289	36.588	0.005	1.345	0.017
		Vitória (VIX)		0.014	0.198	0.671	0.237	42.346	0.006	3.304	0.047
	Campanha 6 (set out 2021)	Abrolhos (ABR)	Zooplâncton	0.613	0.052	0.144	0.569	86.866	0.090	0.913	0.247
		Barra Nova (BN)		0.092	0.047	0.290	0.331	17.388	0.081	0.315	0.326
		Costa das Algas (CA)		0.090	0.077	0.634	0.458	69.929	0.028	2.194	0.193
		Degredo (DEG)		0.293	0.013	0.794	0.706	2.226	0.052	12.602	0.724
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.040	0.006	0.161	0.375	119.676	0.047	0.926	0.159
		Guarapari (GUA)		0.161	0.025	0.011	0.061	182.007	0.055	0.053	0.022
		Itaúnas (ITA)		0.131	0.114	0.299	0.331	51.971	0.062	0.327	0.324
		Vitória (VIX)		0.117	0.047	0.308	0.364	248.565	0.097	0.339	0.338
	Campanha 7 (mar 2022)	Barra Nova (BN)	Zooplâncton	0.653	4.728	3.595	1.855	476.295	0.113	34.313	0.050
		Costa das Algas (CA)		0.201	0.919	1.281	1.705	221.412	0.046	3.838	0.965
		Degredo (DEG)		0.186	2.623	2.380	4.123	277.956	0.067	14.872	0.621
		Foz do Rio Doce (FRD)		0.482	1.115	1.609	2.144	422.015	0.068	7.550	0.553
		Guarapari (GUA)		0.216	0.158	2.347	0.829	258.444	0.049	38.694	1.991
		Itaúnas (ITA)		0.108	2.233	4.095	1.899	545.633	0.075	7.524	0.032
		Vitória (VIX)		0.193	0.734	1.545	2.470	784.076	0.070	21.698	2.639

Figura 2: Índice de bioacumulação de metais e As (IBR bioacumulação) no plâncton coletado 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). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



Os resultados do IBR bioacumulação mostraram um aumento nos níveis dos elementos na comunidade planctônica marinha em todos os setores amostrais, durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), quando comparados àqueles observados nas campanhas anteriores. Neste último período amostral, os setores Sul, foz do Rio Doce e Norte se destacaram com relação aos demais períodos monitorados. Porém, o setor Norte apresentou os maiores valores do índice, indicando assim maiores níveis de bioacumulação nos organismos da base da cadeia trófica. Este aumento na bioacumulação de metais e As no zooplâncton indica um maior grau de contaminação ou maior biodisponibilidade de metais no ambiente marinho no período chuvoso de 2022.

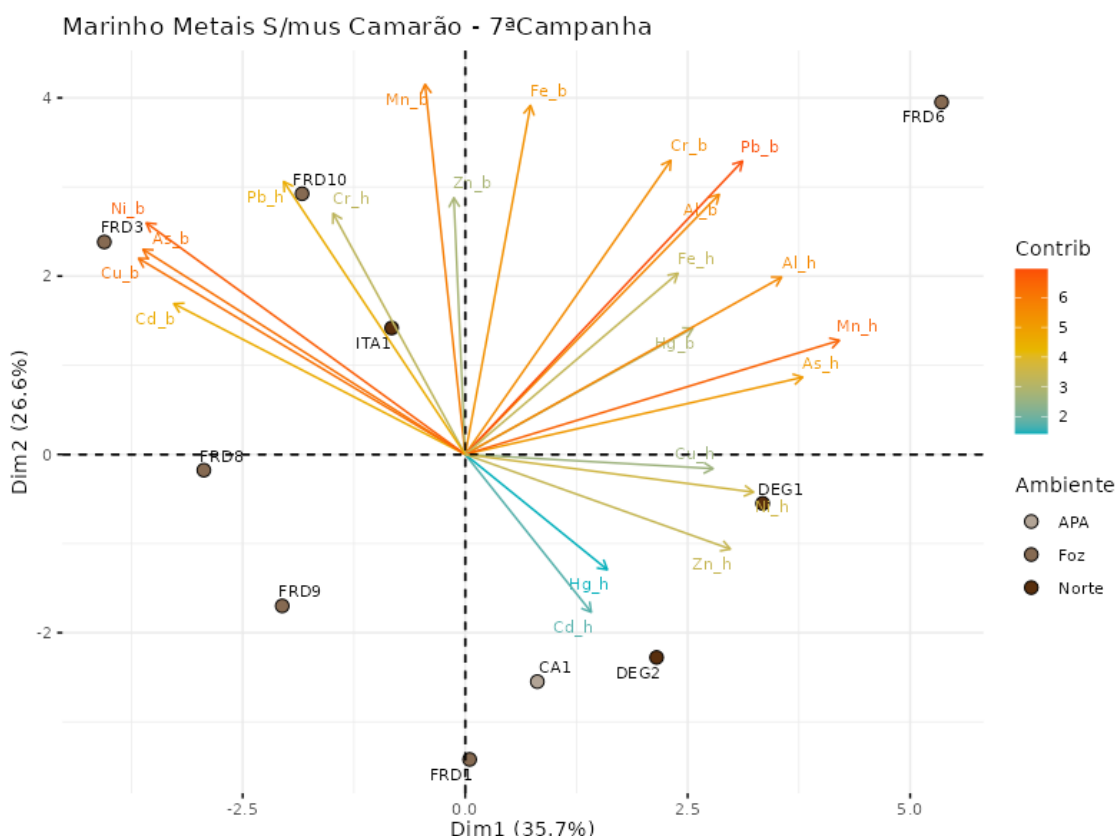
Figura 3: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice de bioacumulação de metais e As (IBR bioacumulação) no plâncton coletado nos diferentes setores do ambiente dulcícola durante a Campanha 1 (set/out 2018 – período seco), Campanha 2 (jan/fev 2019 – período chuvoso), Campanha 3 (set/out 2019 – período 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), mostrando a variação espaço-temporal de cada metal e a contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



Os resultados do IBR bioacumulação mostraram um aumento nos níveis dos elementos na comunidade planctônica marinha em todos os setores amostrais, durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7

- mar 2022), quando comparados àqueles observados nas campanhas anteriores. Os gráficos de radar evidenciam a contribuição de metais característicos do rejeito para o valor atribuído. Por exemplo, no caso do setor Norte, os elementos mais bioacumulados pelo plâncton foram Cd, Cr, Fe Hg e Mn.

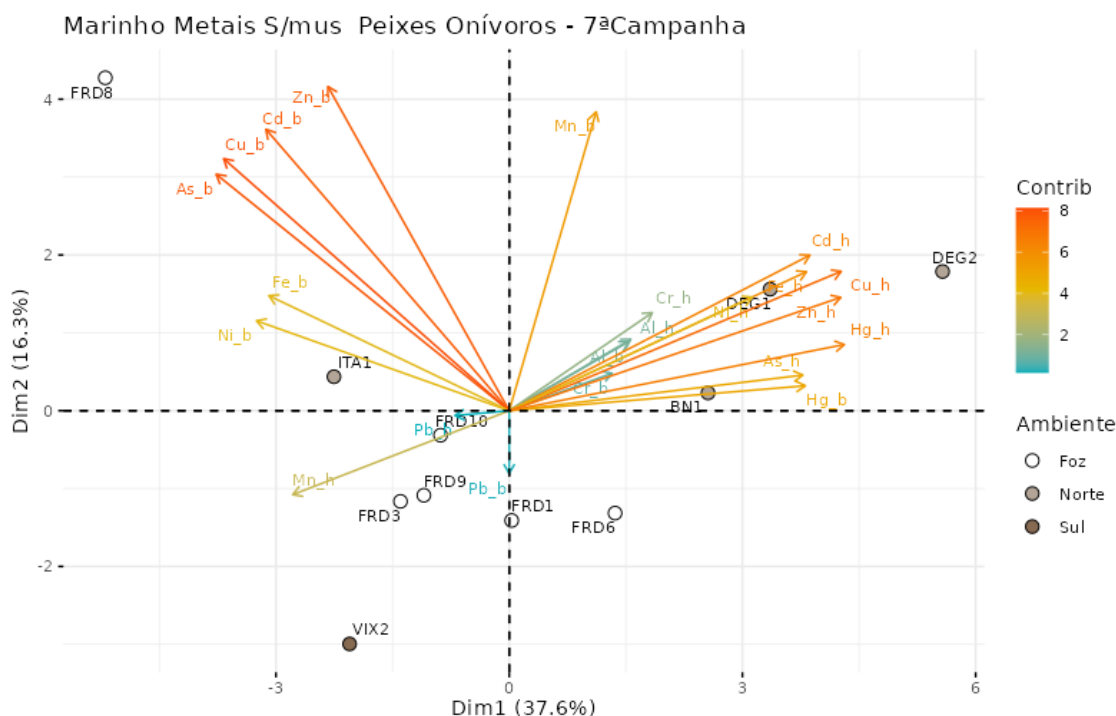
Figura 4: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração dos elementos Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) nas amostras de brânquias (b) e hepatopâncreas (h) de camarões marinhos coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Classificação por setores: APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG) e Itaúnas (ITA)].



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 35,7% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 26,6% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 62,3% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a 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 marinhos. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. É possível observar uma associação dos pontos amostrais localizados na foz do Rio Doce, com destaque para FRD6, FRD3 e FRD10, com as concentrações da maioria dos elementos avaliados. É interessante notar que as concentrações de todos os elementos analisados nas brânquias dos camarões se associaram melhor com alguns pontos amostrais destas três localidades da foz do Rio Doce, o que pode ser um indicativo de contaminação aguda no setor Foz. Ademais, os pontos amostrais nas localidades de Degredo

(DEG1 e DEG2) e Itaúnas (ITA1), ambas localizadas ao norte da foz do Rio Doce, também apresentaram associações com as concentrações de diversos elementos analisados no hepatopâncreas dos camarões, fornecendo assim evidências de uma contaminação mais crônica, seguindo da foz do Rio Doce em direção ao Norte.

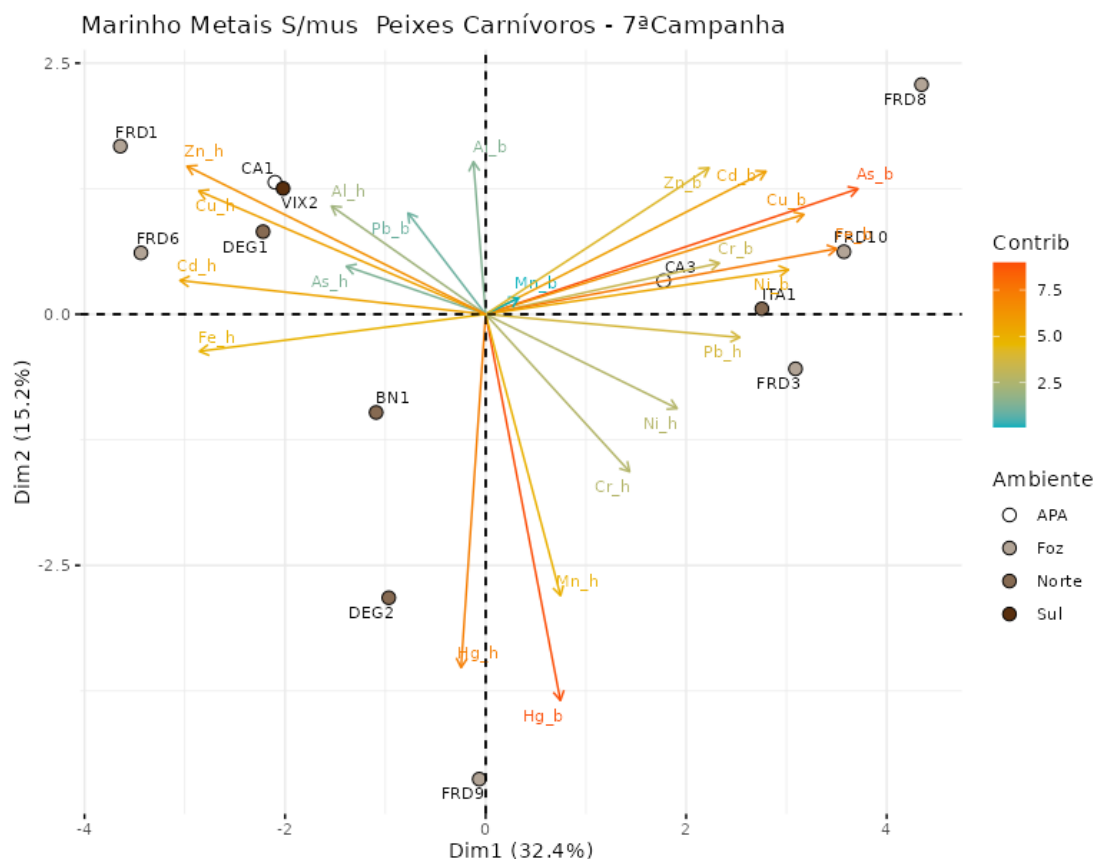
Figura 5: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração dos elementos Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) nas amostras de brânquias (b) e fígado (f) de peixes onívoros/herbívoros marinhos coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 37,6% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 16,3% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 62,3% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a 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 onívoros/herbívoros. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. A PCA gerou uma ordenação que também sustenta os resultados obtidos para camarões, onde maioria das concentrações dos elementos analisados nas brânquias estiveram associadas às estações amostrais localizadas na foz do Rio Doce, com destaque para o ponto amostral FRD8. Por sua vez, as

concentrações dos elementos analisados no fígado estiveram associadas às estações amostrais localizadas em Degredo (DEG1 e DEG2) e Barra Nova (BN1).

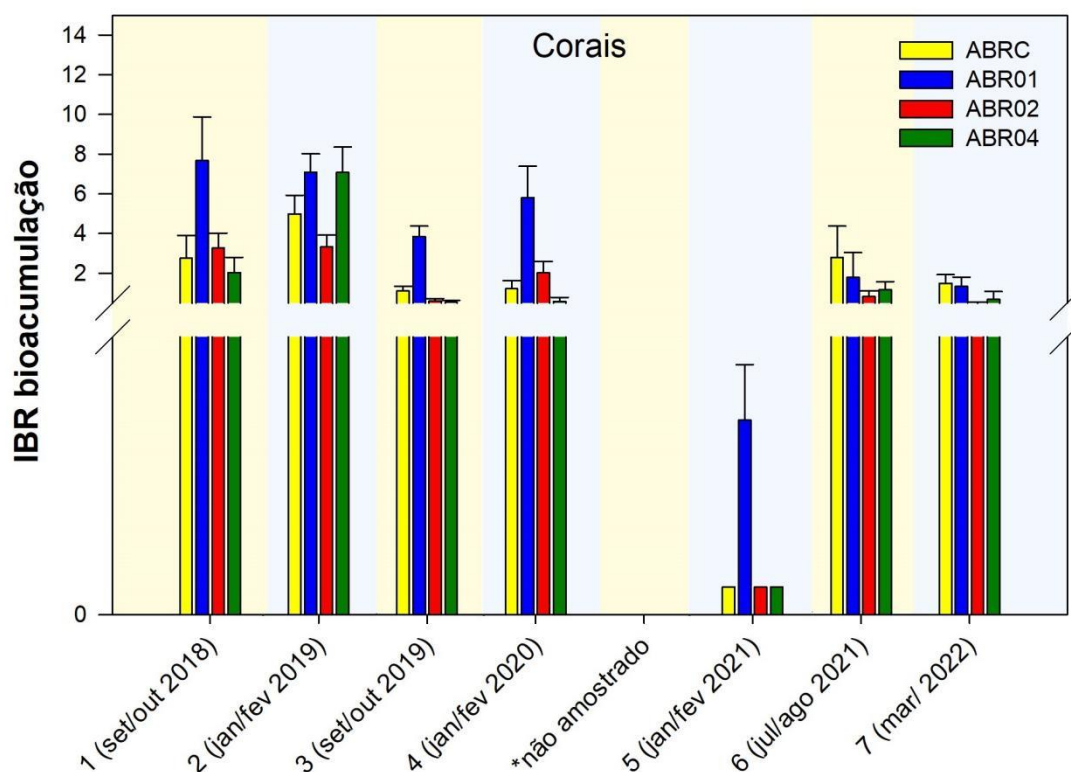
Figura 6: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada para os dados de concentração dos elementos Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) nas amostras de brânquias (b) e fígado (f) de peixes carnívoros marinhos coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



A nPCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 32,4% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 15,2% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 47,6% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a 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. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. A ordenação gerada pela PCA com os resultados referentes aos peixes carnívoros, mostrou um padrão de bioacumulação mais difuso quando comparado aos resultados observados para peixes onívoros/herbívoros. Todavia, é possível perceber que as concentrações da maioria dos elementos analisados nas brânquias estiveram associadas aos organismos coletados nos pontos amostrais localizados na foz do Rio Doce (FRD8 e FRD10). Porém, organismos coletados em pontos amostrais localizados mais distantes da foz do Rio Doce tanto ao sul, como na Costa das Algas (CA3) quanto ao norte, como em Itaúnas (ITA1),

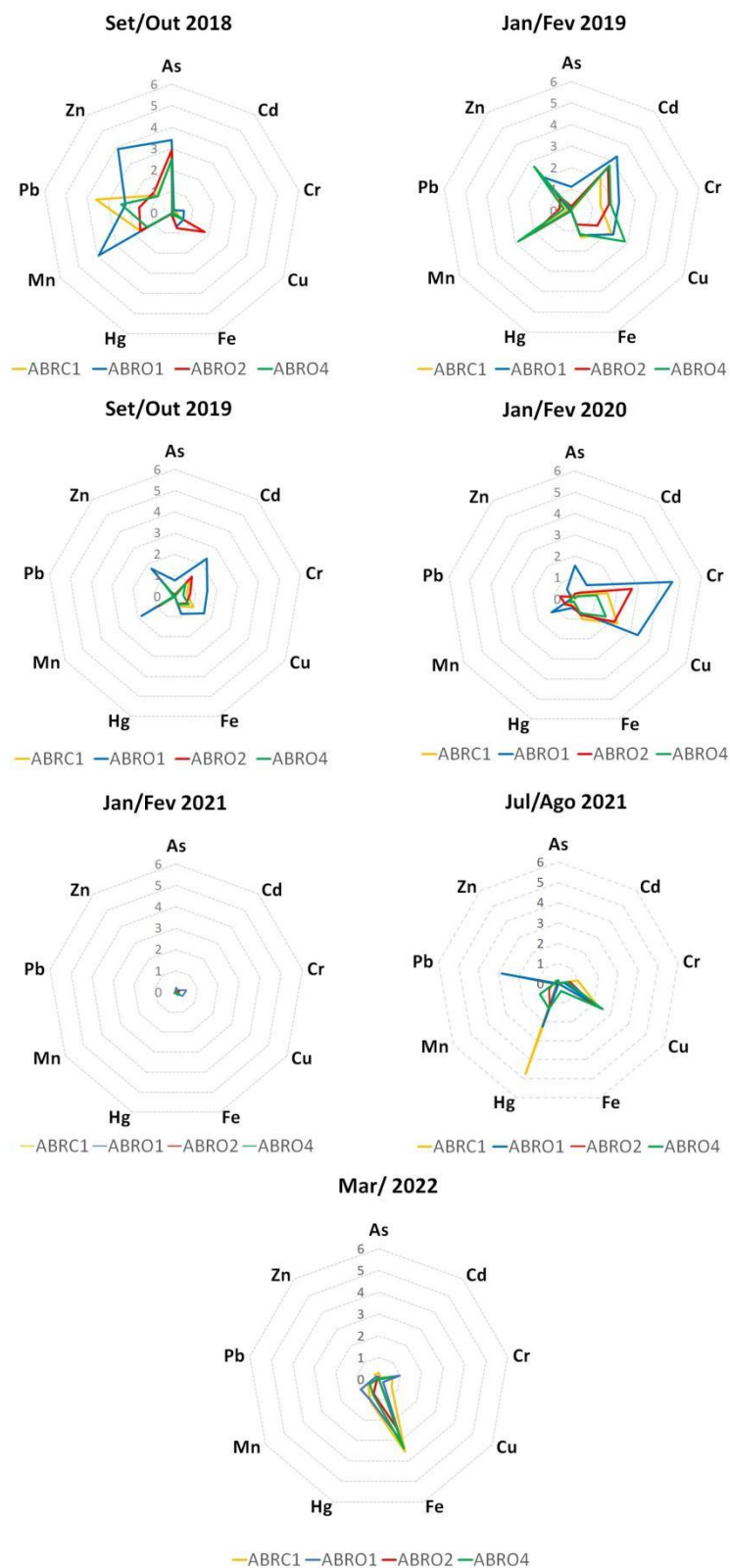
também se destacaram para esta análise. As concentrações dos elementos analisados no fígado de peixes carnívoros mostraram associações com os pontos amostrais de diversas localidades, não sendo possível estabelecer um padrão espacial de contaminação.

Figura 7: Valores do Índice de bioacumulação de metais e As (IBR bioacumulação) em corais coletados nas estações amostrais na localidade de Abrolhos (ABR01, ABR02, ABR04 e ABRC) 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).



O IBR bioacumulação mostrou pouca diferenciação nos níveis dos elementos bioacumulados, ao longo de todo o monitoramento, com exceção do período chuvoso de 2021 (Campanha 5 - jan/fev 2021). Todavia, quando cada elemento é analisado individualmente, é possível observar que o Fe se destacou como principal elemento acumulado nos corais e hidrocorais coletados no último período chuvoso (Campanha 7 - mar/ 2022).

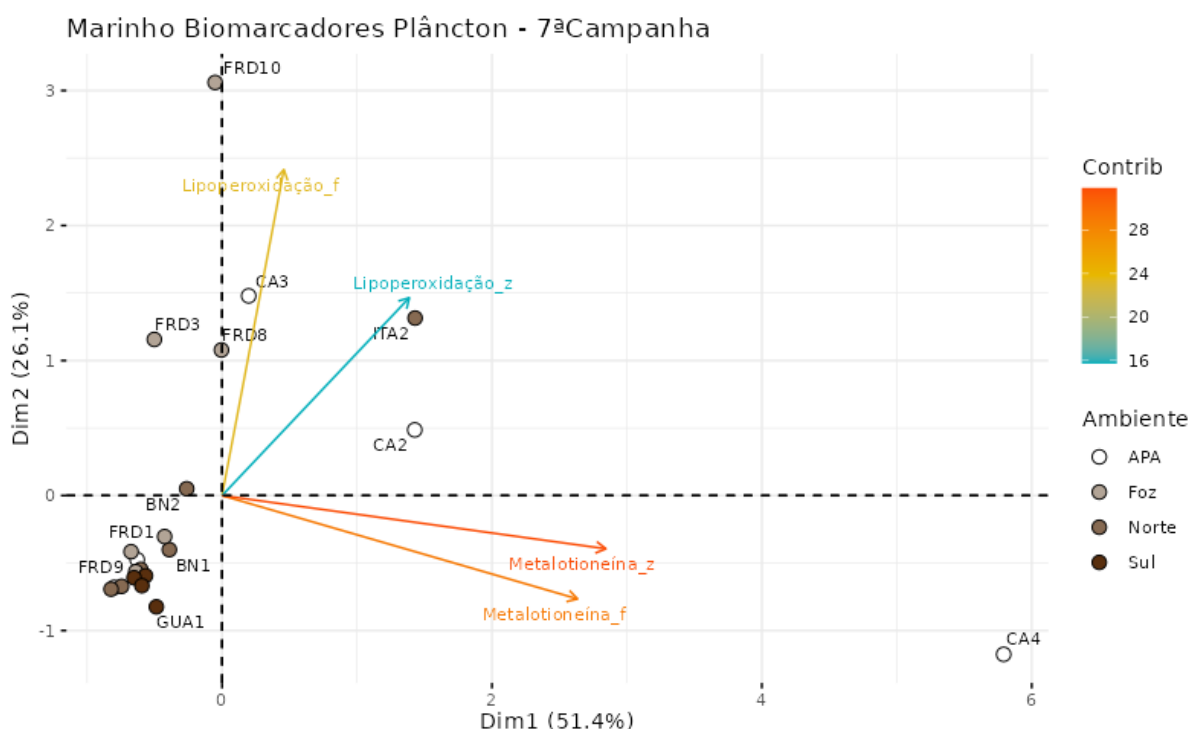
Figura 8: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice de bioacumulação de metais e As (IBR bioacumulação) de corais coletados nas estações amostrais na localidade de Abrolhos (ABR01, ABR02, ABR04 e ABRC) durante a Campanha 1 (set/out 2018 – período seco), Campanha 2 (jan/fev 2019 – período chuvoso), 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), mostrando a variação espaço temporal de cada metal e a contribuição destes para a composição do índice.



O IBR bioacumulação mostrou pouca diferenciação nos níveis dos elementos bioacumulados, ao longo de todo o monitoramento, com exceção do período chuvoso de 2021 (Campanha 5 - jan/fev 2021). Todavia, quando cada elemento é analisado individualmente, é possível observar que o Fe se destacou como principal elemento acumulado nos corais e hidrocorais coletados no último período chuvoso (Campanha 7 - mar/ 2022), em todas as estações amostrais da região de Abrolhos.

3.2 ÍNDICE DE RESPOSTA BIOLÓGICA (*IBR biomarcador*)

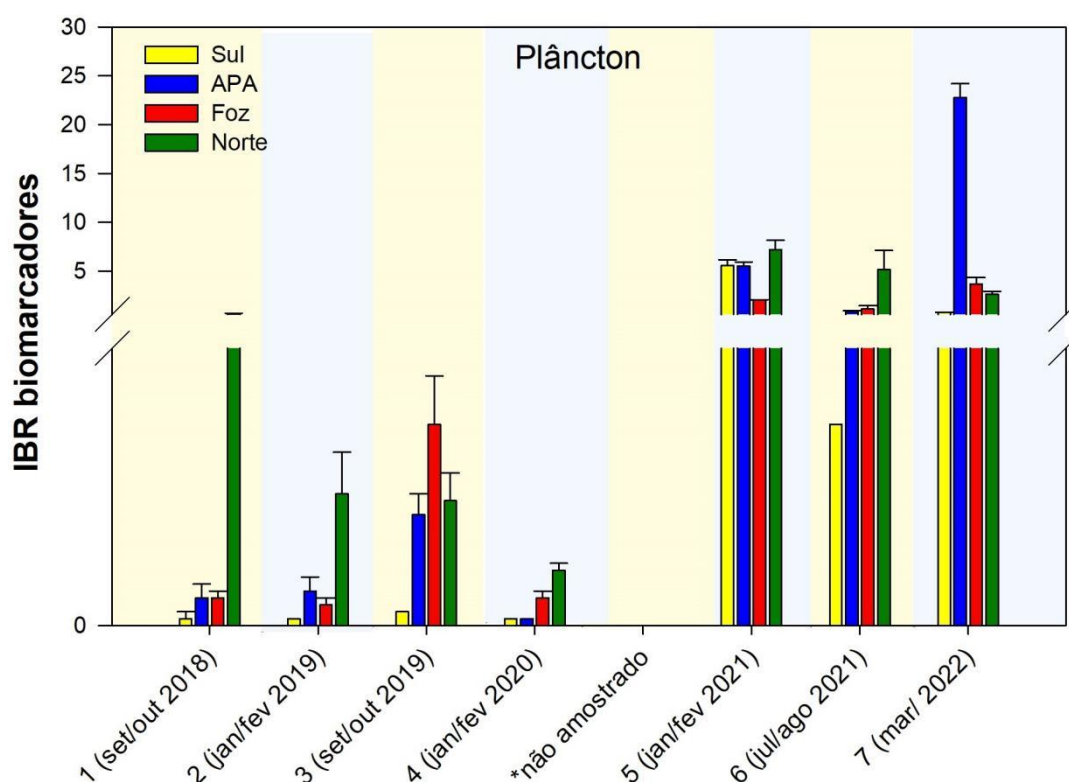
Figura 9: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos dados de biomarcadores de lipoperoxidação (LPO) e concentração de metalotioneínas (MT) mensurados em amostras de plâncton [fito (_f) e zooplâncton (_z)] coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 51,4% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 26,1% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 77,5% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a 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) analisadas na comunidade planctônica. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável. Neste sentido, pode ser observado que os organismos coletados nas estações amostrais localizadas na Costa das Algas (CA2 e CA3), foz do Rio Doce (FRD3, FRD8 e FRD10) e Itaúnas (ITA2) foram agrupados

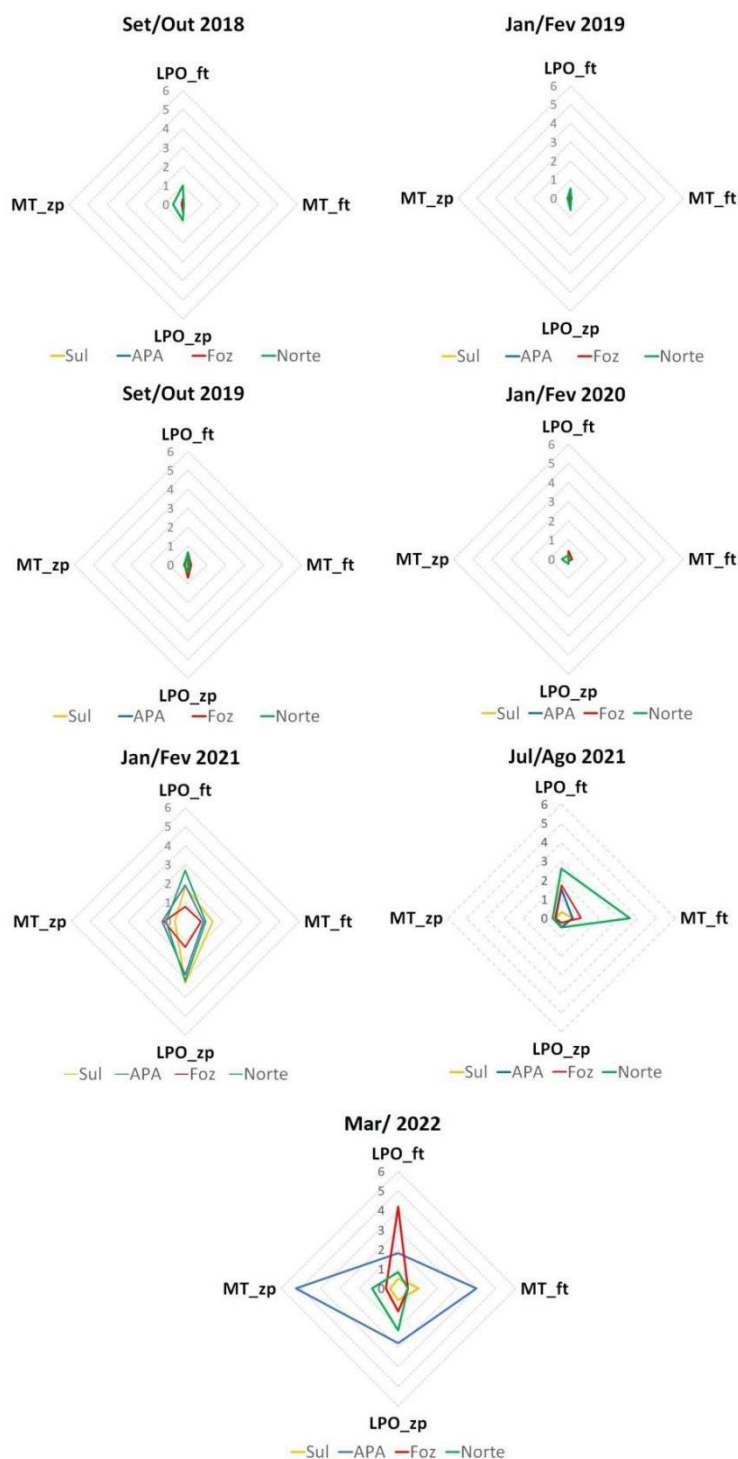
nos quadrantes superiores, os quais estão caracterizados por altos níveis de lipoperoxidação (LPO), enquanto os organismos coletados na estação CA4, visualizada no quadrante inferior, mostraram-se associados com maiores níveis de metalotioneínas (MT).

Figura 10: Valores do Índice da resposta biológica (IBR biomarcador) para a comunidade planctônica no ambiente marinho amostrada 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). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)], e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



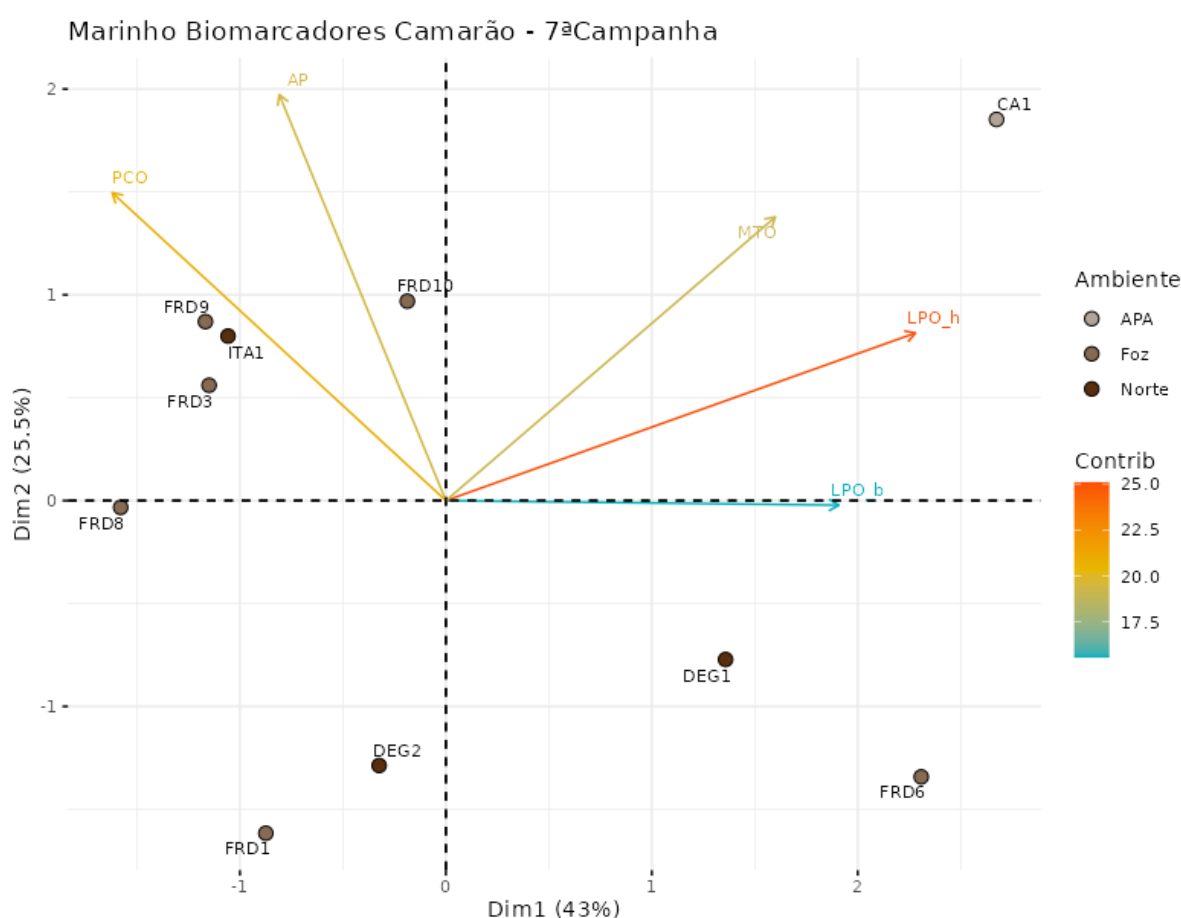
Os resultados do IBR biomarcador indicaram um notável aumento nos níveis de resposta (lipoperoxidação e concentração de metalotioneínas) no plâncton coletado em todos os setores, nas três últimas campanhas realizadas (Campanha 5 - jan/fev 2021, Campanha 6 - jul/ago 2021 e Campanha 7 - mar/ 2022), em comparação com aqueles níveis de resposta observados nos períodos amostrais anteriores, sugerindo assim um efeito crônico da contaminação ambiental sobre as respostas biológicas do plâncton. Durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 -mar 2022), os organismos coletados no setor APA se destacaram daqueles coletados nos demais setores, apresentando o maior nível de efeito biológico durante este último período amostral, decorrente de um aumento na concentração de metalotioneínas (MTs) no fitoplâncton e zooplâncton, bem como um aumento da lipoperoxidação (LPO) no zooplâncton.

Figura 11: Gráficos de radar obtidos a partir do índice da resposta biológica (IBR biomarcador) no plâncton marinho coletado 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) nos setores Sul (Guarapari e Vitória), APA (Costa das Alagas), Foz (foz do Rio Doce) e Norte (Degredo, Barra Nova, Itaúnas), mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e a contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



Os resultados do IBR biomarcador indicaram um notável aumento nos níveis de resposta (lipoperoxidação e concentração de metalotioneínas) no plâncton coletado em todos os setores, nas três últimas campanhas realizadas (Campanha 5 - jan/fev 2021, Campanha 6 - jul/ago 2021 e Campanha 7 - mar/ 2022), em comparação com os níveis de resposta observados nos períodos amostrais anteriores, sugerindo um efeito crônico da contaminação ambiental sobre as respostas biológicas do plâncton. Durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), os organismos coletados no setor APA se destacaram daqueles coletados nos demais setores, apresentando o maior nível de efeito biológico durante este último período amostral, decorrente de um aumento na concentração de metalotioneínas (MTs) no fitoplâncton e zooplâncton, bem como de um aumento na lipoperoxidação (LPO) no zooplâncton.

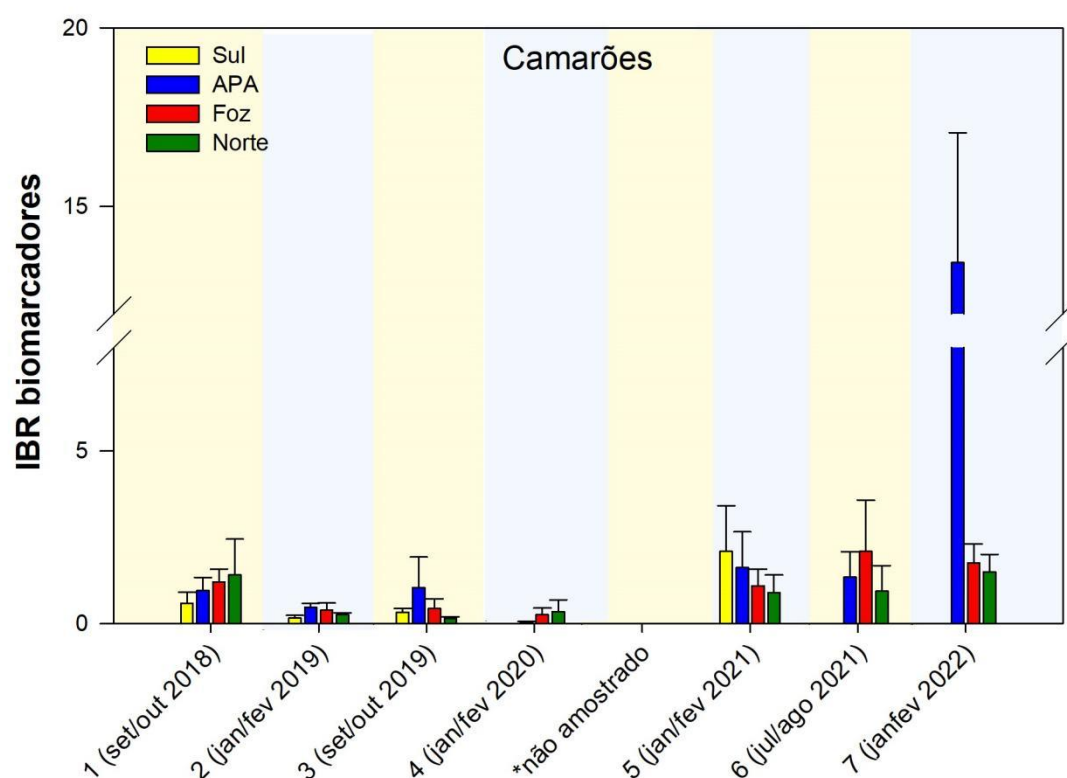
Figura 12: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos dados de biomarcadores lipoperoxidação (LPO; hepatopâncreas e brânquia), concentração de metalotioneínas (MT; hepatopâncreas), proteínas carboniladas (PCO; músculo) e níveis de sítios AP (AP; hemolinfa) mensurados em amostras de camarão coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Classificação por setores: APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 43% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 25,5% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 63,8% da

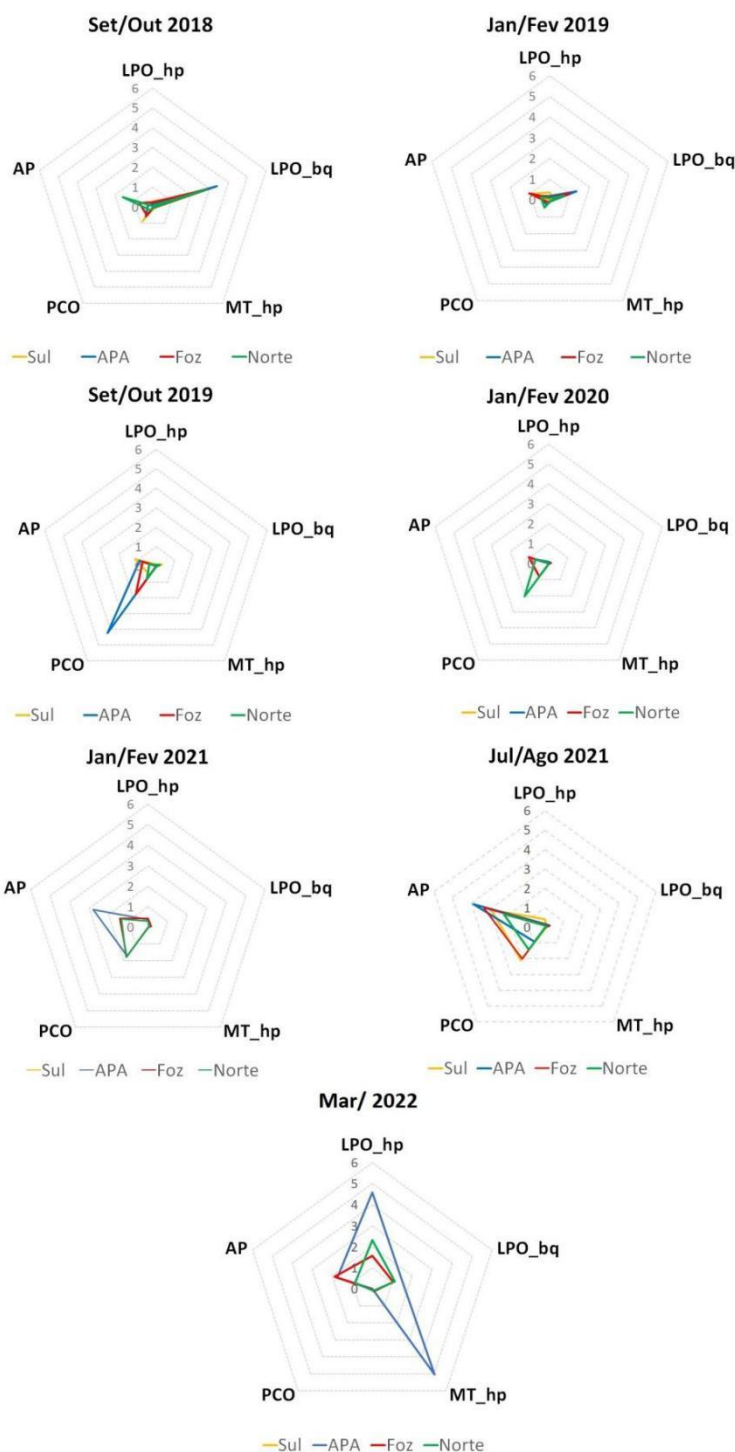
variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a visualização da disposição dos pontos amostrais, em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) analisadas em camarões marinhos. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável.

Figura 13: Valores do Índice da resposta biológica (IBR biomarcador) em camarões marinhos amostrados 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). Durante as Campanhas 4 (jan/fev 2020) e 6 (jul/ago 2021) não foram coletados camarões nos pontos do setor Sul. Classificação por setores: APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



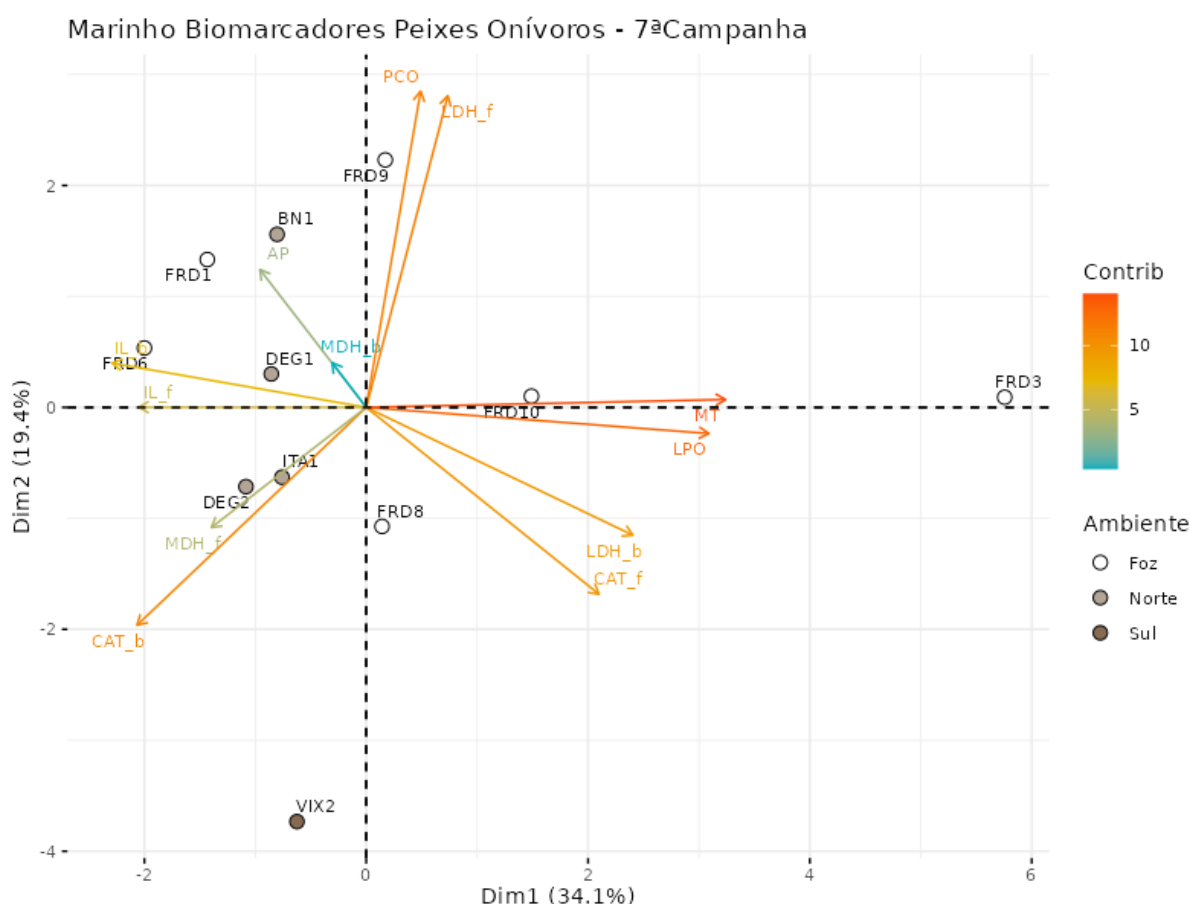
Para os camarões coletados no período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar/ de 2022), foi observado um padrão de resposta semelhante obtido àquele visto para a comunidade planctônica, o qual foi caracterizado por um notável aumento no IBR biomarcador nos organismos coletados no setor APA. Este aumento também foi decorrente de um aumento na concentração de MTs e do nível de LPO no hepatopâncreas dos camarões coletados neste setor.

Figura 14: Gráficos de radar obtidos a partir do índice da resposta biológica (IBR biomarcador) em camarões marinhos coletados 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), mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e a contribuição destes para a composição do índice. Durante as Campanhas 4 (jan/fev 2020) e 6 (jul/ago 2021) não foram coletados camarões nos pontos do setor Sul. Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



Para os camarões coletados no período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), foi observado um padrão de resposta semelhante ao obtido para a comunidade planctônica, o qual foi caracterizado por um notável aumento no IBR biomarcador nos organismos coletados no setor APA. Este aumento também foi decorrente de um aumento na concentração de MTs e do nível de LPO no hepatopâncreas dos camarões coletados neste setor.

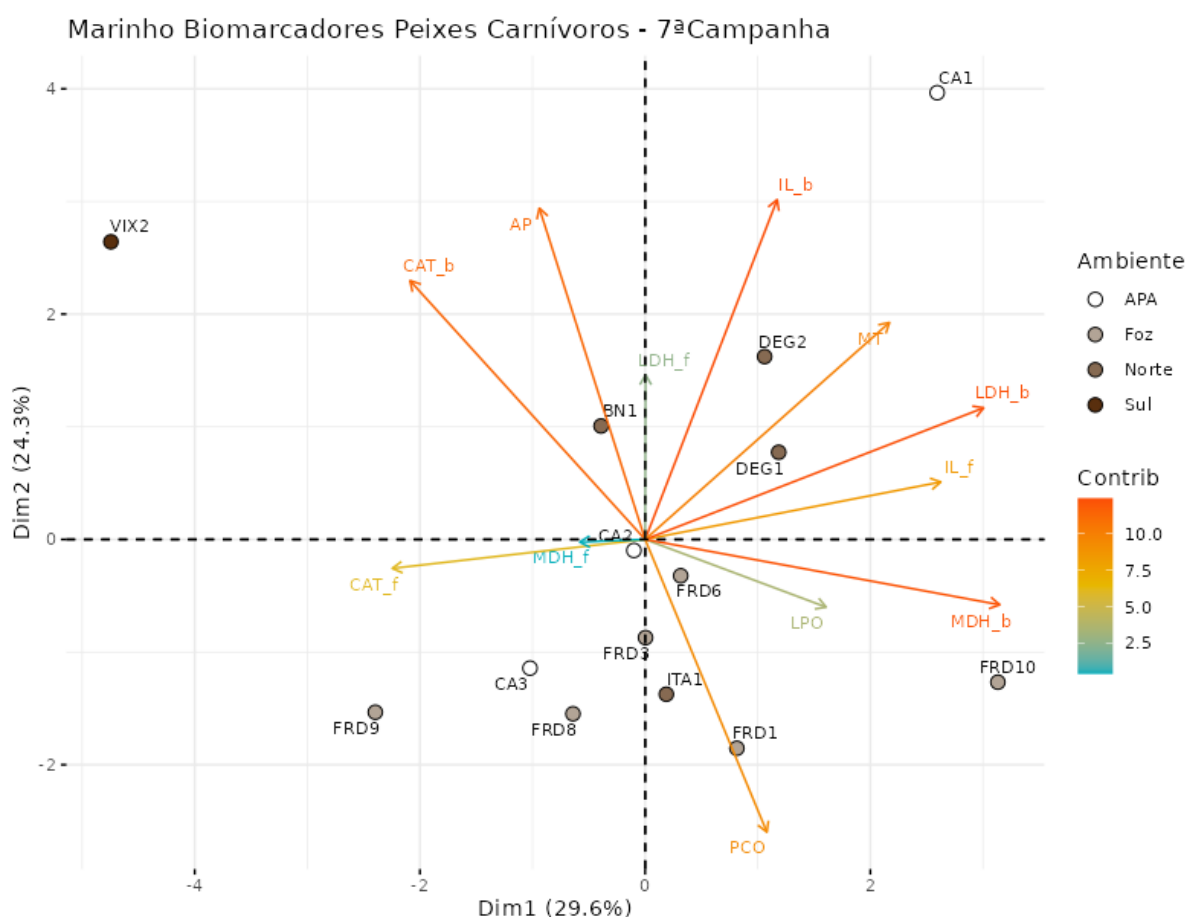
Figura 15: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos dados dos biomarcadores mensurados em tecidos de peixes do grupo I (onívoros/herbívoros) coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Códigos dos biomarcadores: LPO (lipoperoxidação no fígado), MT (concentração de metalotioneína no fígado), PCO (níveis de proteínas carboniladas no músculo), AP (níveis de sítios AP no sangue), IL_f (índices médios de lesões histopatológicas no fígado), IL_b (índices médios de lesões histopatológicas na brânquia), CAT (atividade da enzima catalase em brânquia [b] e fígado [f]), LDH (atividade da enzima lactato desidrogenase em brânquia [b] e fígado [f]) e MDH (atividade da enzima malato desidrogenase em brânquia [b] e fígado [f]). Código das áreas amostrais: Sul [Vitória (VIX)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG) e Itaúnas (ITA)].



A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 34,1% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 19,4% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 53,5% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a visualização da disposição dos pontos amostrais,

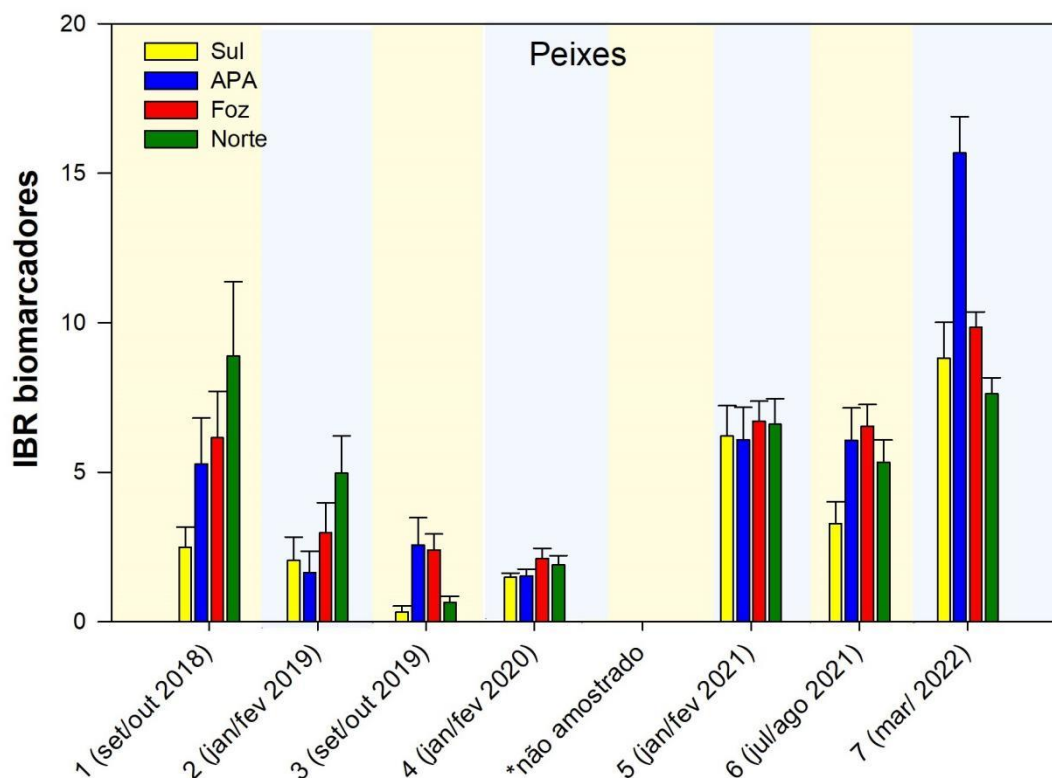
em função dos dois principais componentes. A análise por quadrantes permite agrupar os pontos amostrais, bem como verificar a relação com as variáveis biológicas (respostas de biomarcadores) analisadas em peixes onívoros/herbívoros. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável.

Figura 16: Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada aos dados dos biomarcadores mensurados em tecidos de peixes do grupo I (onívoros/herbívoros) coletados durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). Códigos dos biomarcadores: LPO (lipoperoxidação no fígado), MT (concentração de metalotioneína no fígado), AP (níveis de sítios AP no sangue), IL_f (índices médios de lesões histopatológicas no fígado), IL_b (índices médios de lesões histopatológicas na brânquia), CAT (atividade da enzima catalase em brânquia [b] e fígado [f]), LDH (atividade da enzima lactato desidrogenase em brânquia [b] e fígado [f]) e MDH (atividade da enzima malato desidrogenase em brânquia [b] e fígado [f]). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



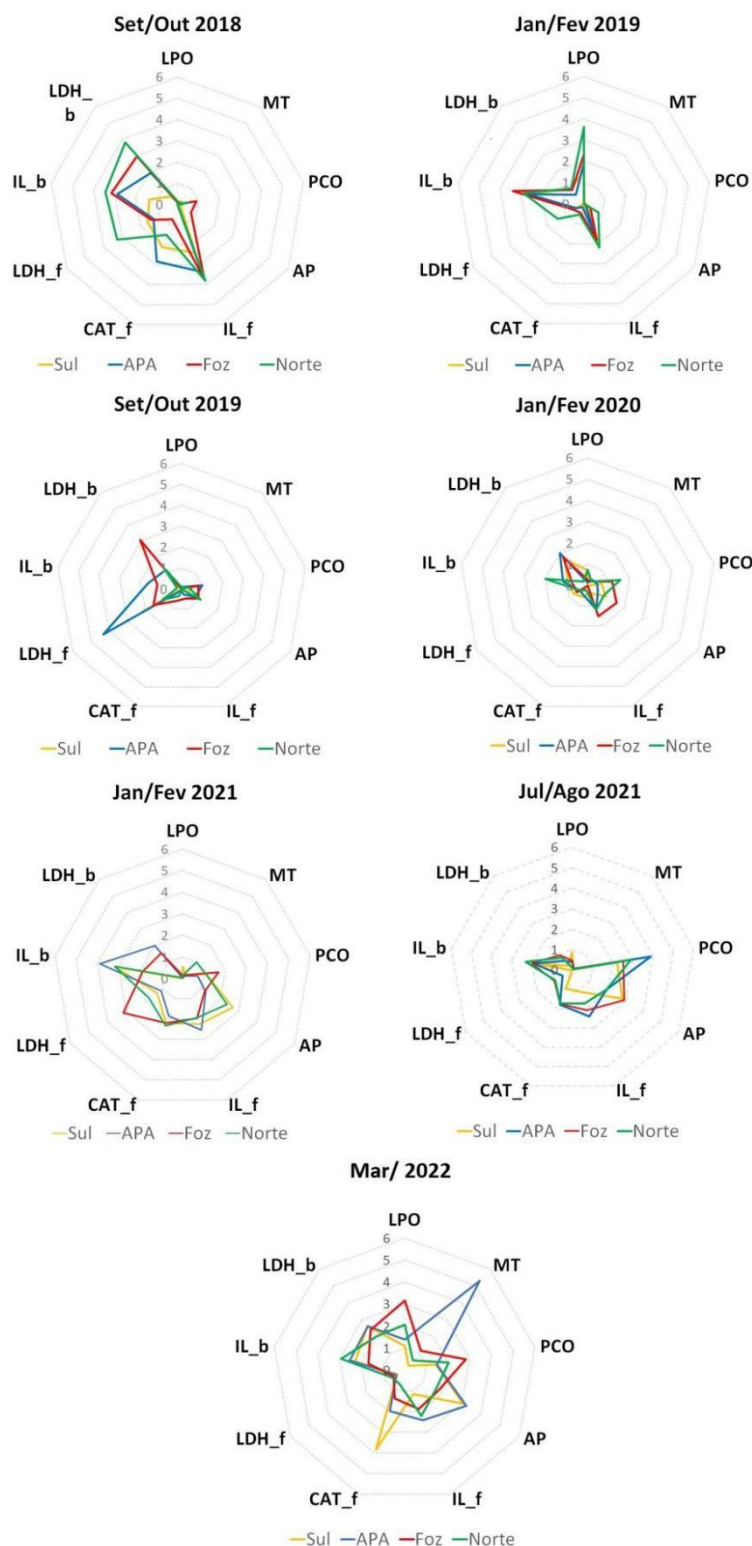
A PCA demonstra o quanto cada grupo de variáveis explica a variabilidade total dos dados. No presente caso, o primeiro componente responde por 29,6% da variabilidade, enquanto o segundo componente responde por 24,3% da variabilidade dos dados. Juntos, os dois componentes explicam 53,9% da variabilidade total dos dados. Essa Figura auxilia a 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) analisadas em peixes carnívoros. As setas indicam o efeito positivo ou negativo da variável.

Figura 17: Valores do Índice da resposta biológica (IBR biomarcador) em peixes marinhos amostrados 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). Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



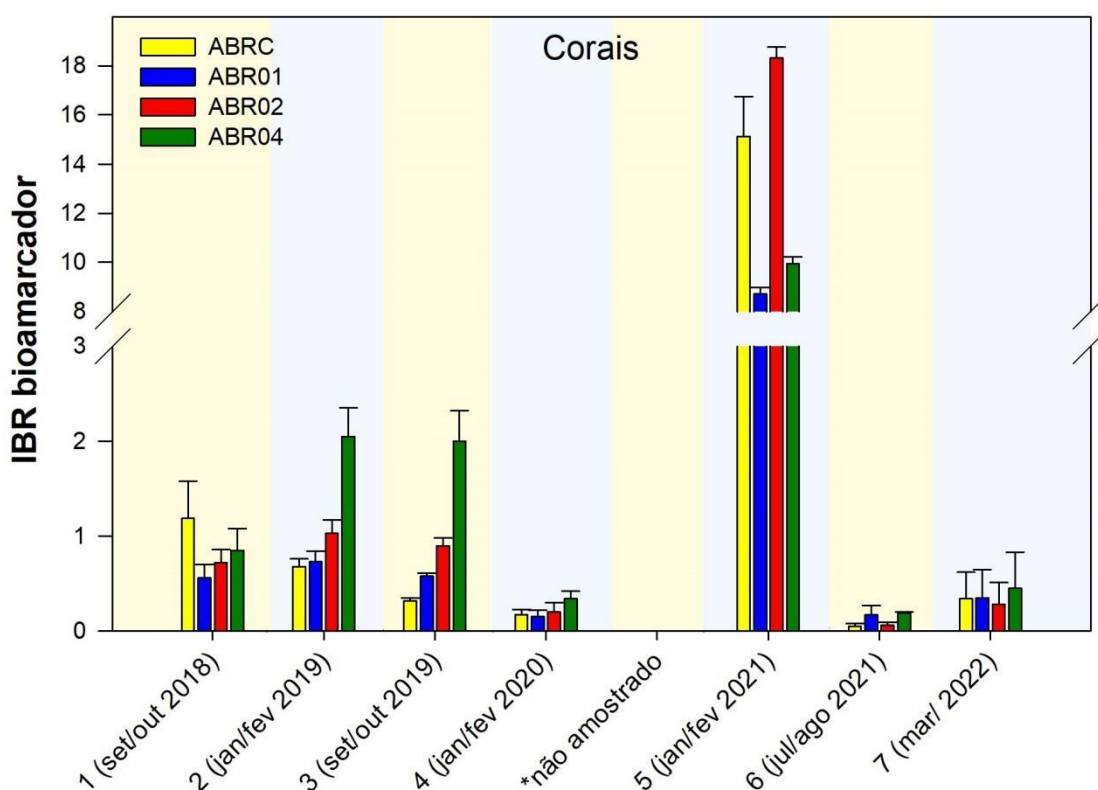
Corroborando os resultados obtidos para os níveis tróficos inferiores, os resultados do IBR biomarcador obtidos para a comunidade de peixes marinhos (onívoros/herbívoros e carnívoros) apontaram para um maior efeito biológico nos organismos coletados no setor APA, durante o período chuvoso de 2022, onde novamente se destaca o aumento no conteúdo de MTs no fígado destes animais. Em conjunto, estes resultados sugerem que a biota marinha está respondendo ao possível aumento da contaminação ambiental no setor APA durante este último período amostral, o qual foi marcado por uma intensa pluviosidade. Esta indicação está baseada no aumento da concentração das MTs, proteínas cuja função biológica está relacionada à regulação da concentração de metais livres e proteção contra situações de estresse oxidativo.

Figura 18: Gráficos de radar obtidos a partir do Índice da resposta biológica (IBR biomarcador) em peixes marinhos coletados 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), mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e a contribuição destes para a composição do índice. Classificação por setores: Sul [Vitória (VIX) e Guarapari (GUA)], APA [Costa das Algas (CA)], Foz [foz do Rio Doce (FRD)] e Norte [Degredo (DEG), Barra Nova (BN) e Itaúnas (ITA)].



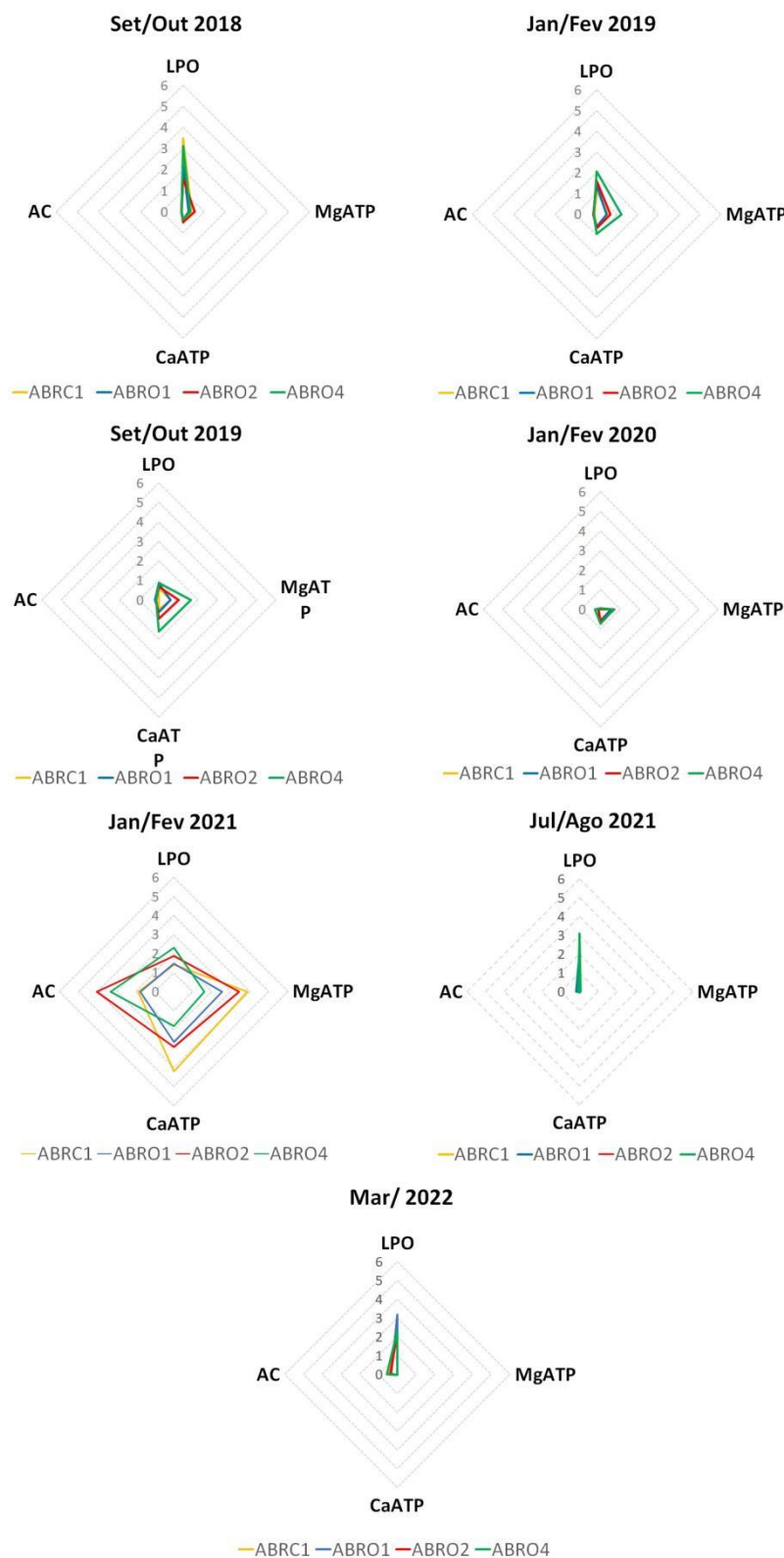
Corroborando os resultados obtidos para os níveis tróficos inferiores, os resultados do IBR biomarcador obtidos para a comunidade de peixes marinhos (onívoros/herbívoros e carnívoros) apontaram para um maior efeito biológico nos organismos coletados no setor APA, durante o período chuvoso de 2022, onde novamente se destaca o aumento no conteúdo de MTs no fígado destes animais.

Figura 19: Valores do Índice da resposta biológica (IBR biomarcador) em amostras de corais (*Mussismilia harttii*) e hidrocorais (*Millepora alcicornis*) coletadas 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), nos pontos da região de Abrolhos (ABR01, ABR02, ABR04 e ABRC1).



Para os corais e hidrocorais amostrados no setor Abrolhos, o IBR biomarcador não indicou variações significativas entre os organismos coletados nos diferentes pontos amostrais durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022). Cabe destacar que este resultado foi semelhante àquele obtido para o IBR bioacumulação para estes organismos. Porém, a LPO foi o biomarcador que mais contribuiu para os valores do índice.

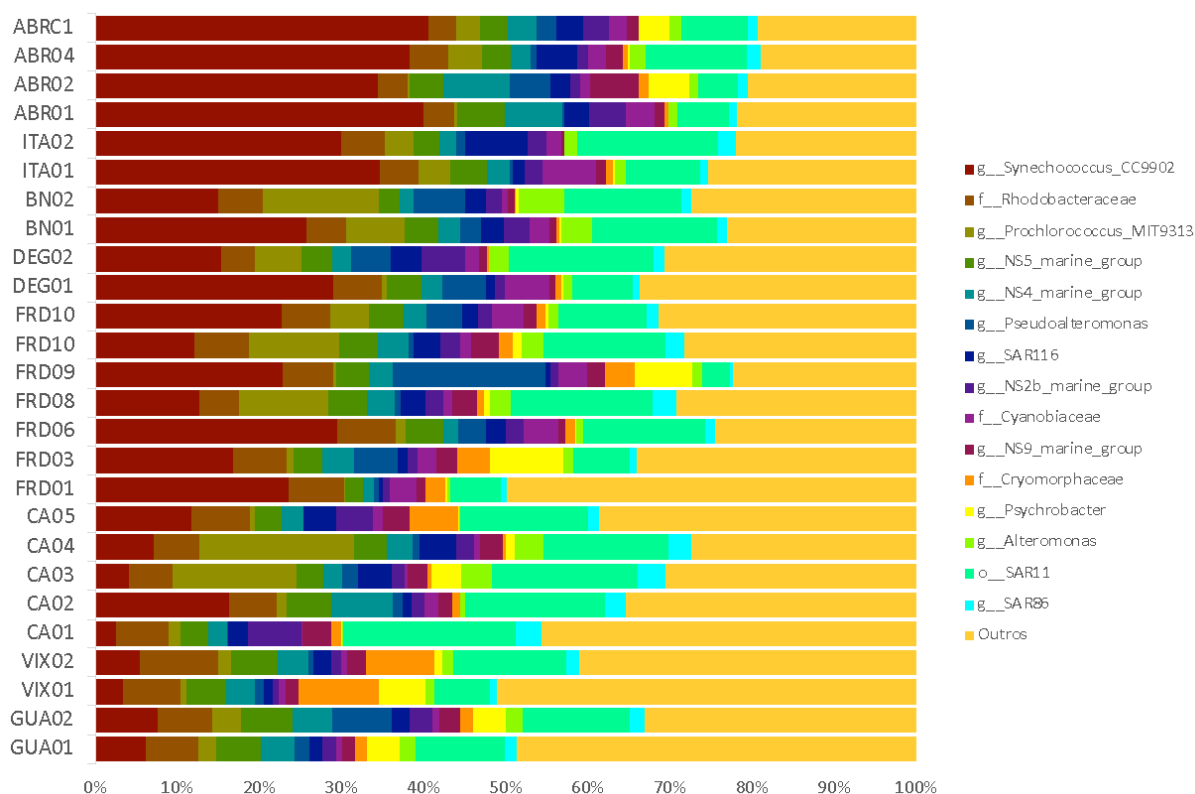
Figura 20: Gráficos de radar obtidos a partir Índice da resposta biológica (IBR biomarcador) em amostras de corais (*Mussismilia harttii*) e hidrocorais (*Millepora alcicornis*) amostradas na localidade de Abrolhos (ABR01, ABR02, ABR04 e ABRC1) durante a Campanha 1 (set/out 2018 – período seco), Campanha 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), mostrando a variação espaço temporal de cada biomarcador e a contribuição destes para a composição do índice.



Para os corais e hidrocorais amostrados no setor Abrolhos, o IBR biomarcador não indicou variações significativas entre os organismos coletados nos diferentes pontos amostrais durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022). Cabe destacar que este resultado foi semelhante àquele obtido para o IBR bioacumulação para estes organismos. Porém, a LPO foi o biomarcador que mais contribuiu para os valores do índice.

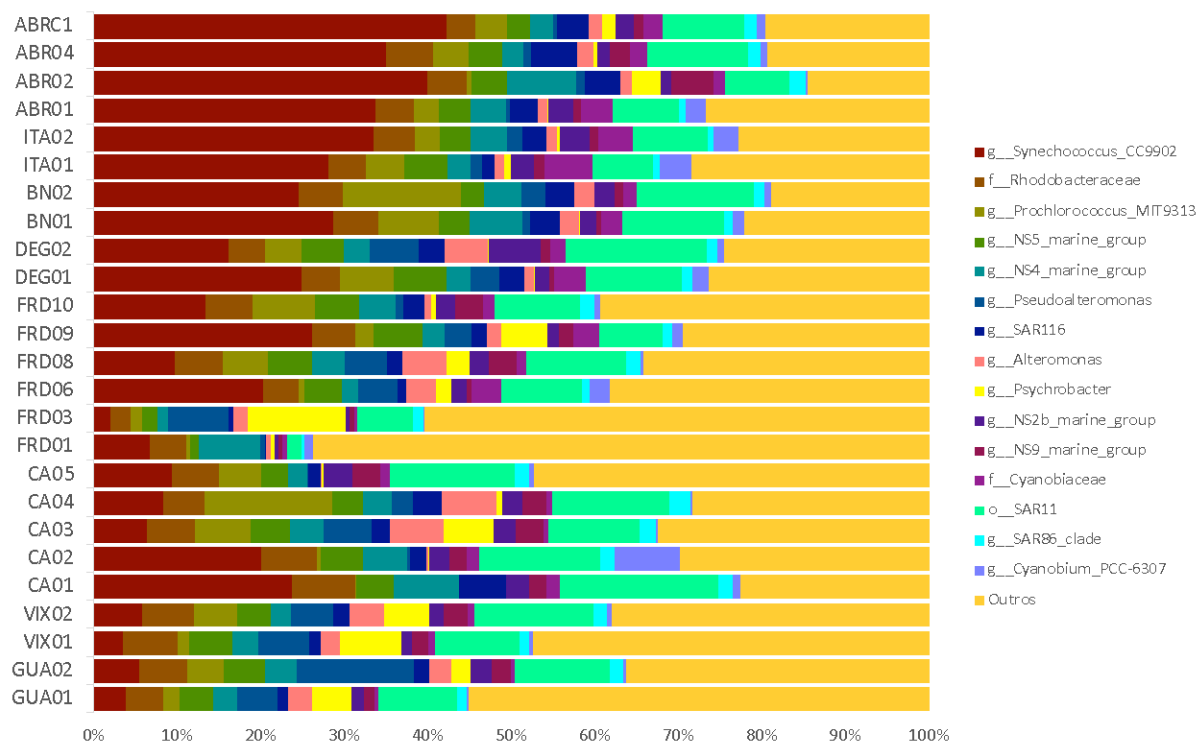
3.3 DIVERSIDADE MICROBIANA

Figura 21: Classificação taxonômica das amostras de água de superfície da foz do Rio Doce e região costeira adjacente coletadas durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”. Código das estações amostrais: Guarapari (GUA1 e GUA2), Vitória (VIX1 e VIX2), Costa das Algas (CA1, CA2, CA3, CA4 e CA5), foz do Rio Doce (FRD1, FRD3, FRD6, FRD8, FRD9 e FRD10), Degredo (DEG1 e DEG2), Barra Nova (BN1 e BN2), Itaúnas (ITA1 e ITA2) e Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04).



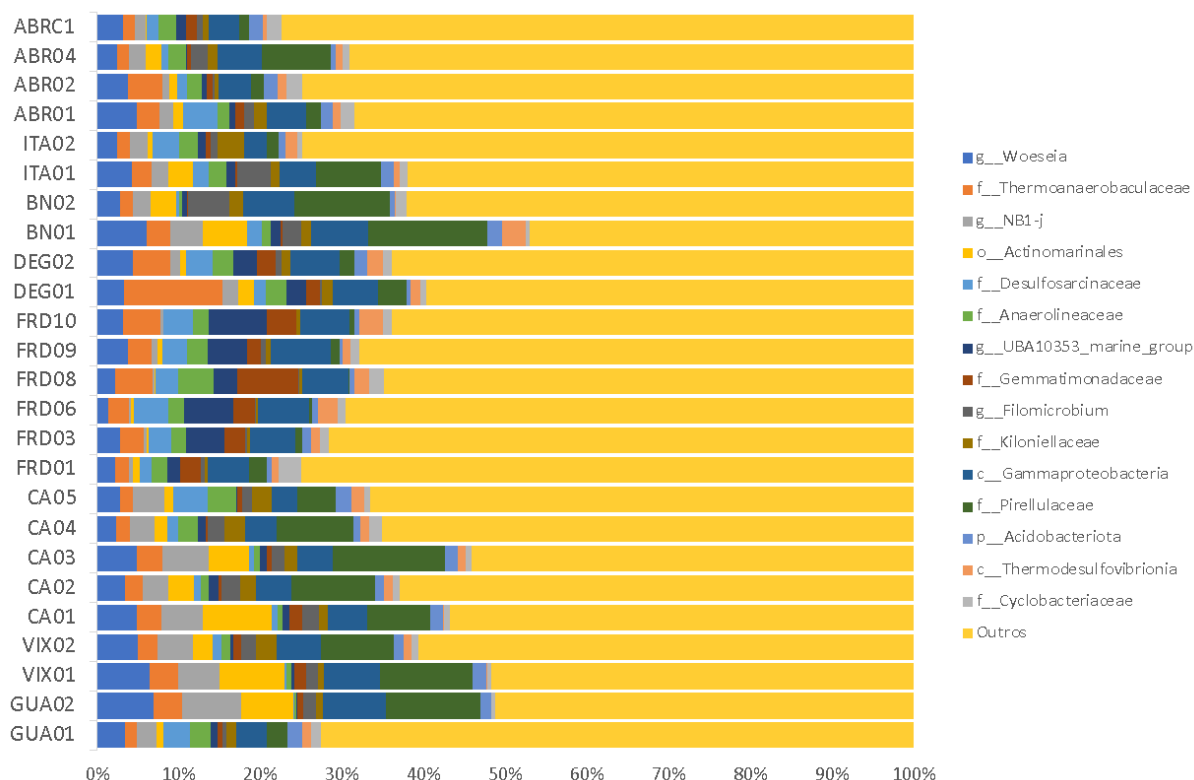
A abundância relativa das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) nas amostras de água de superfície coletadas na região marinha no período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022) apresentou elevada dominância de grupos bacterianos já observados anteriormente (Synechococcus CC9902 e SAR11). Considerando-se todas as 25 estações de coleta analisadas no ambiente marinho, estes grupos foram responsáveis por 19 e 12% da abundância relativa, respectivamente. De acordo com o sequenciamento realizado, a presença de Synechococcus CC9902 aumenta gradualmente nas estações amostrais de sul para norte, indo de, em média, 6% em Guarapari para 40% na região de Abrolhos. Por outro lado, essa variação não foi observada para SAR11, visto que a distribuição deste táxon acontece de forma mais homogênea geograficamente.

Figura 22: Classificação taxonômica das amostras de água de fundo da foz do Rio Doce e região costeira adjacente coletadas durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”. Código das estações amostrais: Guarapari (GUA1 e GUA2), Vitória (VIX1 e VIX2), Costa das Algas (CA1, CA2, CA3, CA4 e CA5), foz do Rio Doce (FRD1, FRD3, FRD6, FRD8, FRD9 e FRD10), Degredo (DEG1 e DEG2), Barra Nova (BN1 e BN2), Itaúnas (ITA1 e ITA2) e Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04).



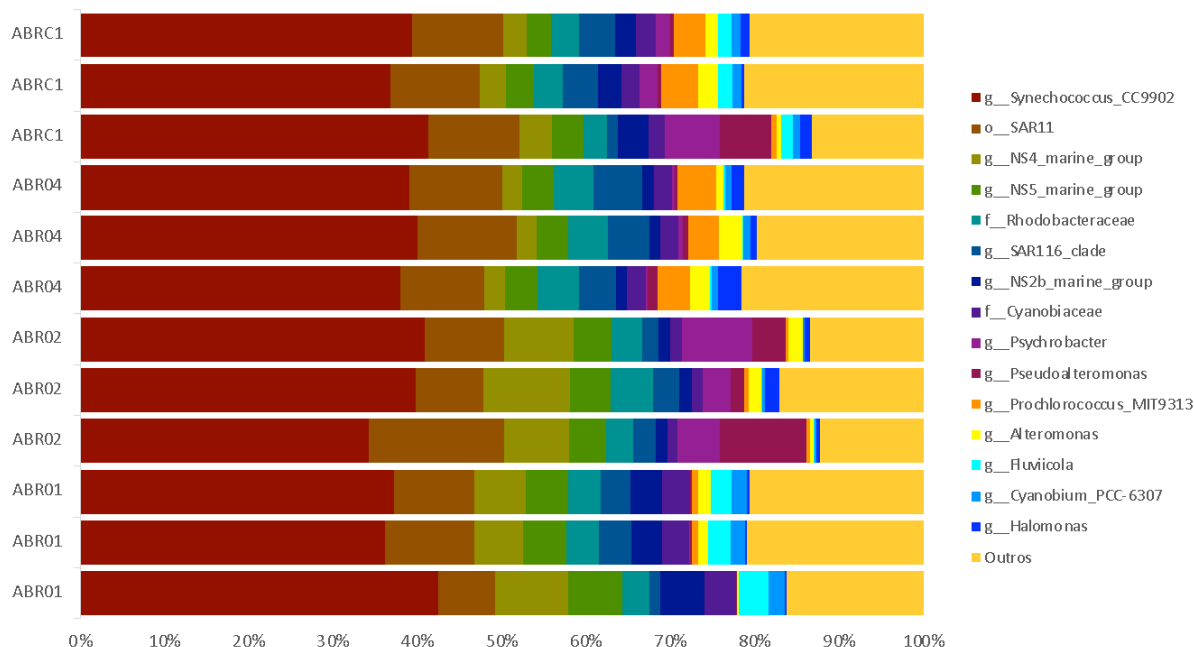
A análise das amostras de água de fundo mostrou um perfil muito similar àquele observado para água de superfície. As maiores abundâncias observadas também foram de *Synechococcus* CC9902 e SAR11. Cabe salientar que *Synechococcus* CC9902 também apresentou elevação em sua dominância nas estações amostrais localizadas mais ao norte da foz do Rio Doce e próximas da região de Abrolhos.

Figura 23: Classificação taxonômica das amostras de sedimento da foz do Rio Doce e região costeira adjacente coletadas durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”. Código das estações amostrais: Guarapari (GUA1 e GUA2), Vitória (VIX1 e VIX2), Costa das Algas (CA1, CA2, CA3, CA4 e CA5), foz do Rio Doce (FRD1, FRD3, FRD6, FRD8, FRD9 e FRD10), Degredo (DEG1 e DEG2), Barra Nova (BN1 e BN2), Itaúnas (ITA1 e ITA2) e Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04).



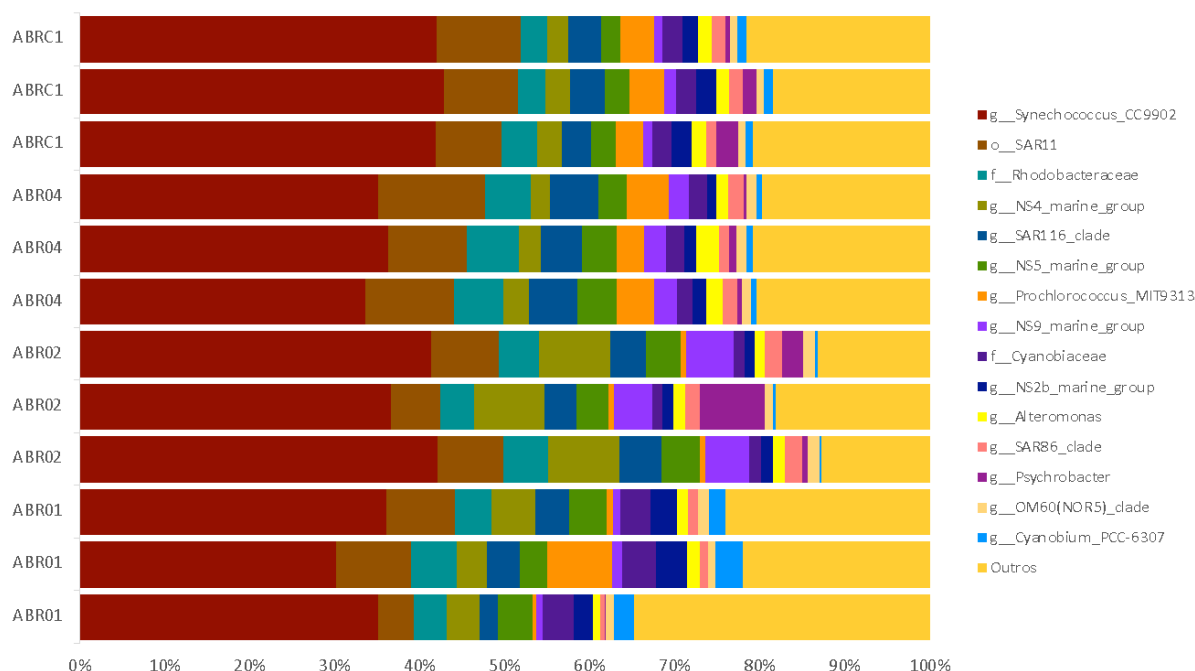
As amostras de sedimento coletadas no período chuvoso de 2022 (Campanha 7, mar/ 2022) apresentaram maior diversidade microbiológica quando comparadas às amostras de água. Isto pode ser observado pela falta de grupos com elevada dominância. Neste ambiente, os grupos de maior abundância foram Pirellulaceae – 6%, Gammaproteobacteria – 5% e Woeseia – 4%. No último período chuvoso (Campanha 7, mar/ 2022), Pirellulaceae obteve as maiores abundâncias nas estações localizadas ao sul, enquanto a família Anaerolineaceae esteve mais concentrada nas estações localizadas na foz do Rio Doce. Na região da foz e também se observa a presença do gênero UBA10353 (Gammaproteobactéria) e de Gemmatimonadaceae.

Figura 24: Classificação taxonômica das amostras de água de superfície coletadas na região de Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04) durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”.



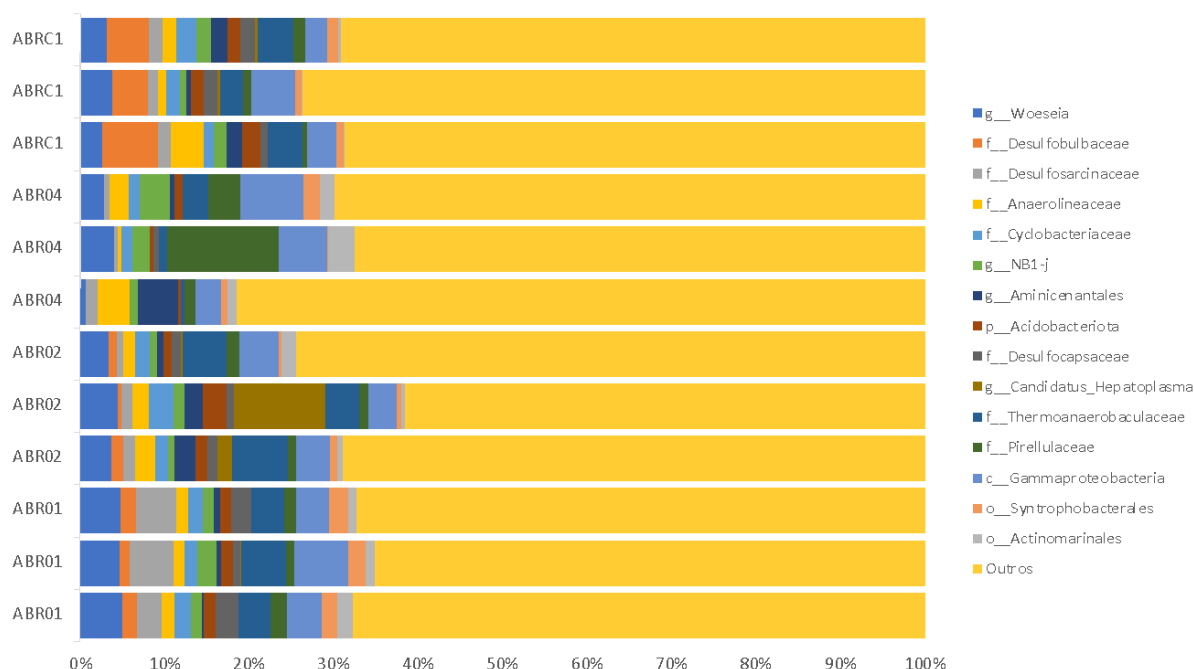
Os grupos bacterianos encontrados nas amostras de água superficial da região de Abrolhos coletadas no período chuvoso de 2022 (Campanha 7, mar/ 2022) apresentaram perfil similar aos grupos bacterianos encontrados em outros pontos da malha amostral marinha. Todavia, na região de Abrolhos existe maior dominância entre os grupos. A média do somatório dos táxons menos abundantes e que são identificados por “Outros” ficou em 18%, contra 31% considerando todas as amostras do ambiente marinho. De forma geral, a água de superfície na região de Abrolhos também é dominada por *Synechococcus_CC9902* seguido pela ordem SAR11. A distribuição de *Synechococcus_CC9902* nas quatro estações analisadas apresenta similaridade. Por outro lado, os grupos NS4 e NS5 parecem estar mais associados às estações ABR01 e ABR02, enquanto que SAR116 apresenta maior influência na estação ABR04.

Figura 25: Classificação taxonômica das amostras de água de fundo coletadas na região de Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04) durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”.



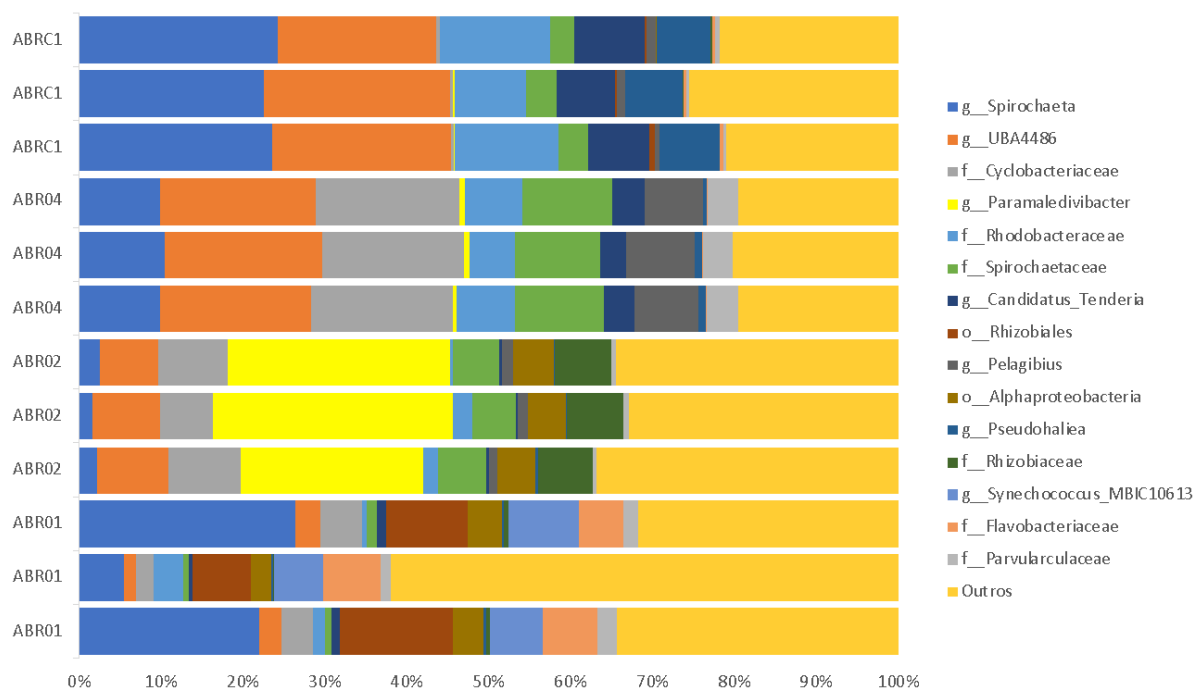
Para amostras de água de fundo, também se observa perfil semelhante àquele visto para a água de superfície. As amostras de água de fundo apresentaram dominância de *Synechococcus_CC9902*, seguido por SAR11. Destaca-se a presença do gênero NS9, pertencente à ordem Flavobacteriales, e que vem sendo relacionado ao aumento de temperatura e da concentração de matéria orgânica dissolvida.

Figura 26: Classificação taxonômica das amostras de sedimento coletadas na região de Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04) durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”.



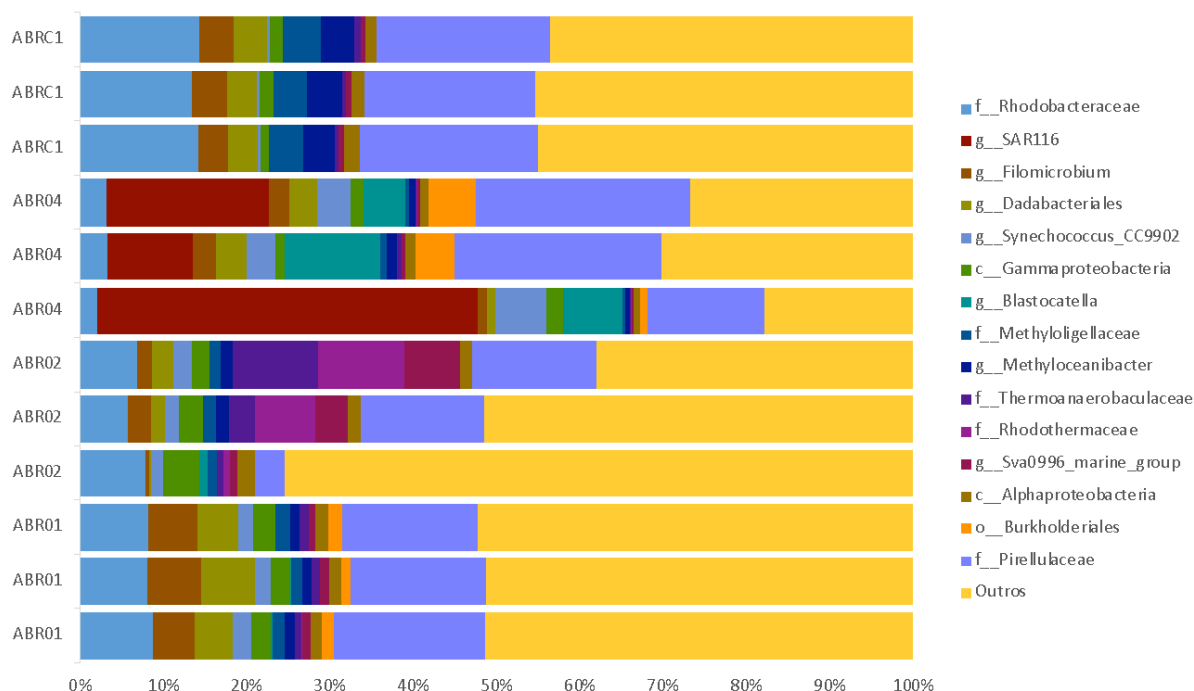
Para as amostras de sedimento coletadas em Abrolhos, pode-se observar uma maior diversidade e menor predominância de alguns grupos. Os táxons mais abundantes foram Woeseia, seguido por Thermoanaerobaculaceae e Gammaproteobactéria. A presença do filo Pirellulaceae também voltou a ser observada nesta campanha, com uma maior abundância na estação amostral ABR04. O grupo Anaerolineaceae também foi observado e se destacou nas estações amostrais ABR04 e ABRC1. Por fim, os grupos Desulfobulbaceae e Desulfosarcinaceae apresentaram elevada presença nas estações amostrais ABRC1 e ABR01, respectivamente. Vale lembrar que estas estações amostrais estão localizadas próximas à costa e a presença destes grupos pode estar relacionada com diversas influências oriundas do continente.

Figura 27: Classificação taxonômica das amostras de coral da espécie *Millepora alcicornis* coletadas na região de Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04) durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”.



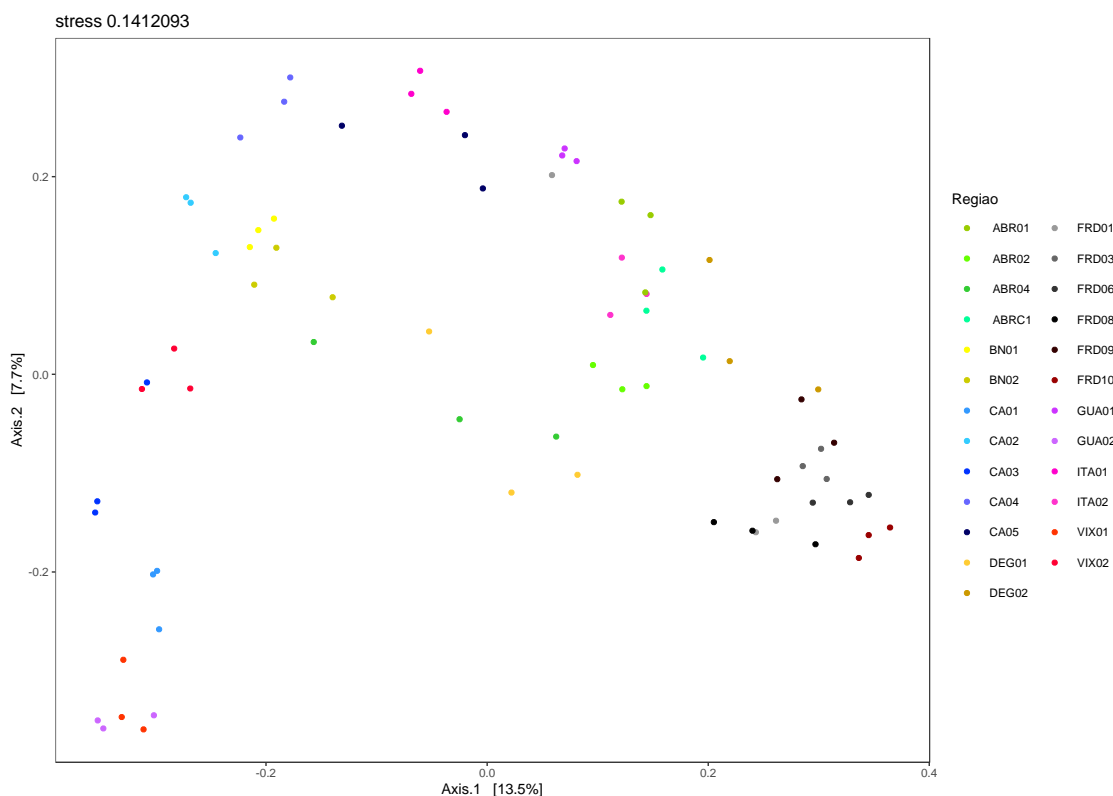
A análise da abundância relativa em amostras de hidrocoral da espécie *Millepora alcicornis* revelou dominância dos grupos Spirochaeta e UBA4486 (ambos com 13%). A única estação amostral que apresentou níveis baixos de Spirochaeta foi ABR02, enquanto a menor dominância de UBA4486 foi observada na estação amostral ABR01. Destaca-se também a elevada concentração de Cyclobacteriaceae na estação amostral ABR04 e Paramaledivibacter na estação amostral ABR02.

Figura 28: Classificação taxonômica das amostras de coral da espécie *Mussismilia hartii* coletadas na região de Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04) durante a Campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso). São mostradas as abundâncias relativas dos Gêneros bacterianos mais encontrados bem como os menos abundantes identificados como “Outros”.



As maiores abundâncias foram observadas para Pirellulaceae (18%), seguida por Rhodobacteraceae (8%) e SAR116 (6%). A grande presença de bactérias do gênero Pirellulaceae, em todas as estações amostral, merece destaque e atenção, visto que este perfil ainda não havia sido observado tão fortemente nas campanhas anteriores. Vale lembrar que esta família já vinha sendo monitorada como forte indicador de contaminação, sendo que na campanha 7 (mar 2022 – período chuvoso) apresentou grande aumento na sua abundância, principalmente nas estações amostrais ABRC1 e ABR04.

Figura 29: Ordenação gerada por análise de componentes principais (PCA) das amostras de sedimento da foz do Rio Doce e região costeira adjacente da Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022). Código das estações amostrais: Guarapari (GUA1 e GUA2), Vitória (VIX1 e VIX2), Costa das Algas (CA1, CA2, CA3, CA4 e CA5), foz do Rio Doce (FRD1, FRD3, FRD6, FRD8, FRD9 e FRD10), Degredo (DEG1 e DEG2), Barra Nova (BN1 e BN2), Itaúnas (ITA1 e ITA2) e Abrolhos (ABRC1, ABR01, ABR02 e ABR04).



No período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), a ordenação gerada pela PCA para as amostras de sedimento revelou uma maior similaridade entre as amostras da foz do Rio Doce com aquelas coletadas em Abrolhos. Cabe destacar que esta tendência já foi observada nas campanhas anteriores. Estes resultados confirmam, portanto, que grupos indicadores relacionados ao rompimento da barragem de Fundão ainda podem ser observados nestes ambientes e que existe uma tendência de mudança dos perfis microbianos além daqueles observados sazonalmente

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. Dos ensaios com sedimento, apenas o ensaio com *Nitokra sp* foi realizado com sedimento total, os demais foram realizados com elutriato, portanto, para *Nitokra sp*, o resultado está expresso como tóxico ou não-tóxico. Código dos pontos amostrais: Costa das Algas (CA1e CA2), foz do Rio Doce (FRD1 e FRD6) e Degredo (DEG1).

Ensaio de toxicidade aguda e crônica - água e sedimento da região marinha/costeira											
Ensaio	Campanha	FRD1 água	FRD1 sedimento	FRD6 água	FRD6 sedimento	CA1 água	CA1 sedimento	CA2 água	CA2 sedimento	DEG1 água	DEG1 sedimento
<i>T. pseudonana</i> (ABNT NBR 16181)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%
		CI50: 100	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE
<i>E. lucunter</i> (Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil – ensaio agudo)	Março de 2022	CENO:50% CEO: 100%	CENO: >100%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO >100%	CENO: <3,1% CEO: 3,1%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: <3,1% CEO: 3,1%
		CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE
<i>E. lucunter</i> (ABNT NBR 15350 – ensaio crônico)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%
		VC: NE	VC: NE	VC: NE	VC: NE	VC: NE	VC: NE	VC: 70,7%	VC: NE	VC: NE	VC: NE
		CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE	CE50: NE
<i>P. vivipara</i> (OECD – 203)	Março de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	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 da região marinha/costeira

Ensaio	Campanha	FRD1 água	FRD1 sedimento	FRD6 água	FRD6 sedimento	CA1 água	CA1 sedimento	CA2 água	CA2 sedimento	DEG1 água	DEG1 sedimento
<i>Nitokra sp</i> (Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil - ensaio crônico)	Março de 2022	NA	T	NA	T	NA	T	NA	T	NA	T

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; CE50: concentração mediana que causa efeito em 50% dos indivíduos; CENO: concentração de efeito não observado; CEO: concentração de efeito observado; VC: valor crônico (média geométrica de CENO e CEO); 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 agudo com *E. lucunter*, o valor de CEO representa redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$) do número de ovos fecundados com relação ao controle (resultado relativo à reprodução). Para o ensaio crônico com *E. lucunter*, o valor de CEO representa redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$) do número de larvas desenvolvidas com relação ao controle (relativo ao desenvolvimento embrio-larval). A classificação como tóxico no ensaio de *Nitokra sp* representa redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$) do número da prole (resultado relativo à reprodução); enquanto a classificação como não-tóxico é atribuída à diferença não significativa, 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 CI50 ou CE50 foram estimados pelo software Trimmed Spearman Karber (TSK).

Tabela 7: Resultados dos ensaios de toxicidade realizados com amostras coletadas nos pontos FRD1, FRD6, CA1, CA2 e DEG1 em set/out de 2022 (período seco) pelo Tema Ecotoxicologia 1 do PMBA/Fest. Dos ensaios com sedimento, apenas o ensaio com *Nitokra sp* foi realizado com sedimento total, os demais foram realizados com elutriato. Os resultados estão expressos como percentual da amostra-teste que causou toxicidade. Para o ensaio com *Nitokra sp*, o resultado é expresso como tóxico ou não-tóxico.

Ensaio de toxicidade aguda e crônica - água e sedimento da região marinha/costeira											
Ensaio	Campanha	FRD1 água	FRD1 sedimento	FRD6 água	FRD6 sedimento	CA1 água	CA1 sedimento	CA2 água	CA2 sedimento	DEG1 água	DEG1 sedimento
<i>T. pseudonana</i> (ABNT NBR 16181/2021)	Set/Out de 2022	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: >100%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: >100%	CENO: 12,5% CEO: 25%	CENO: >100%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: >100%
		CI50: 85,01	CI50: NE	CI50: 80,73	CI50: NE	CI50: 71,78	CI50: NE	CI50: 75,36	CI50: NE	CI50: NE	CI50: NE
<i>E. lucunter</i> (Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil – ensaio agudo)	Set/Out de 2022	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: 6,2% CEO: 12,5%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: <3,1% CEO: 3,1%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: 12,5% CEO: 25%	CENO: 12,5% CEO: 25%	CENO: 6,2% CEO: 12,5%	CENO: <3,1% CEO: 3,1%
		CE50: NE	CE50: 23,53	CE50: NE	CE50: 10,76	CE50: NE	CE50: NE	CE50: 50,71	CE50: 12,02	CE50: 38,85	CE50: 10,75
<i>E. lucunter</i> (ABNT NBR 15350/2020 – ensaio crônico)	Set/Out de 2022	CENO: >100%	CENO: 6,25% CEO: 12,5%	CENO: 50% CEO: 100%	CENO: <6,25% CEO: 6,25%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: 25% CEO: 50%	CENO: 6,25% CEO: 12,5%	CENO: <6,25% CEO: 6,25%	CENO: 12,5% CEO: 25%	CENO: <6,25% CEO: 6,25%
		VC: NE	VC: 8,8%	VC: 70,7%	VC: NE	VC: 35,3%	VC: 35,3%	VC: 8,8%	VC: NE	VC: 17,6%	VC: NE
		CE50: NE	CE50: 14,67	CE50: NE	CE50: 3,13	CE50: 72,71	CE50: 36,6	CE50: 15,14	CE50: 3,13	CE50: 31,02	CE50: 3,13

Ensaio de toxicidade aguda e crônica - água e sedimento da região marinha/costeira

Ensaio	Campanha	FRD1 água	FRD1 sedimento	FRD6 água	FRD6 sedimento	CA1 água	CA1 sedimento	CA2 água	CA2 sedimento	DEG1 água	DEG1 sedimento
<i>P. vivipara</i> (OECD – 203/2019)	Set/Out de 2022	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%	CENO: >100%
<i>Nitokra sp</i> (Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil - ensaio crônico)	Set/Out de 2022	NA	T	NA	T	NA	T	NA	T	NA	T

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; CE50: concentração mediana que causa efeito em 50% dos indivíduos; CENO: concentração de efeito não observado; CEO: concentração de efeito observado; VC: valor crônico (média geométrica de CENO e CEO); 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 agudo com *E. lucunter*, o valor de CEO representa redução estatisticamente significativa ($p>0,05$) do número de ovos fecundados com relação ao controle (resultado relativo à reprodução). Para o ensaio crônico com *E. lucunter*, o valor de CEO representa redução estatisticamente significativa ($p>0,05$) do número de larvas desenvolvidas com relação ao controle (relativo ao desenvolvimento embrio-larval). A classificação como tóxico no ensaio de *Nitokra sp* representa redução estatisticamente significativa ($p>0,05$) do número da prole (resultado relativo à reprodução); enquanto a classificação como não-tóxico é atribuída à diferença não significativa, 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 CI50 ou CE50 foram estimados pelo software Trimmed Spearman Karber (TSK).

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 (mar/2022 - período chuvoso) do Projeto 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. Código dos pontos amostrais: Costa das Algas (CA1e CA2), foz do Rio Doce (FRD1 e FRD6) e Degredo (DEG1).

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
FRD1/Chuvoso	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	1	1	3	3	LT	1	NT	13	LT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	0	1	3	0	NT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	0	1	3	0	NT	25	LT		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	0	1	3	0	NT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i> (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				
FRD6/Chuvoso	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	1	1	3	3	LT	1	NT	13	LT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	0	1	3	0	NT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	1	1	3	3	LT	26	MT		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	0	1	3	0	NT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	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
		Nitokra sp (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				
CA1/Chuvoso	Água	E. lucunter - agudo	0	1	3	0	NT	0	NT	13	LT
		E. lucunter - crônico	0	1	3	0	NT				
		P. vivipara	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	E. lucunter - agudo (elutriato)	0	1	3	0	NT	25	MT		
		E. lucunter - crônico (elutriato)	0	1	3	0	NT				
		P. vivipara (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		Nitokra sp (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				
	CA2/Chuvoso	Água	E. lucunter - agudo	1	1	3	3	LT	1		
E. lucunter - crônico			0	1	3	0	NT				
P. vivipara			0	2	2	0	NT				
Sedimento		E. lucunter - agudo (elutriato)	33	1	3	99	T	50	MT		
		E. lucunter - crônico (elutriato)	0	1	3	0	NT				
		P. vivipara (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		Nitokra sp (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				

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
DEG1/Chuvoso	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	2	1	3	6	LT	3	LT	26	MT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	1	1	3	3	LT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	33	1	3	99	T	50	MT		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	0	1	3	0	NT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i> (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				

Legenda: UT: unidade tóxica, NT: não tóxica, LT: levemente tóxica, MT: moderadamente tóxica, T: tóxica.

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 FRD1, FRD6, CA1, CA2 e DEG1 em set/out de 2022 (período seco) pelo Tema Ecotoxicologia 1 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.

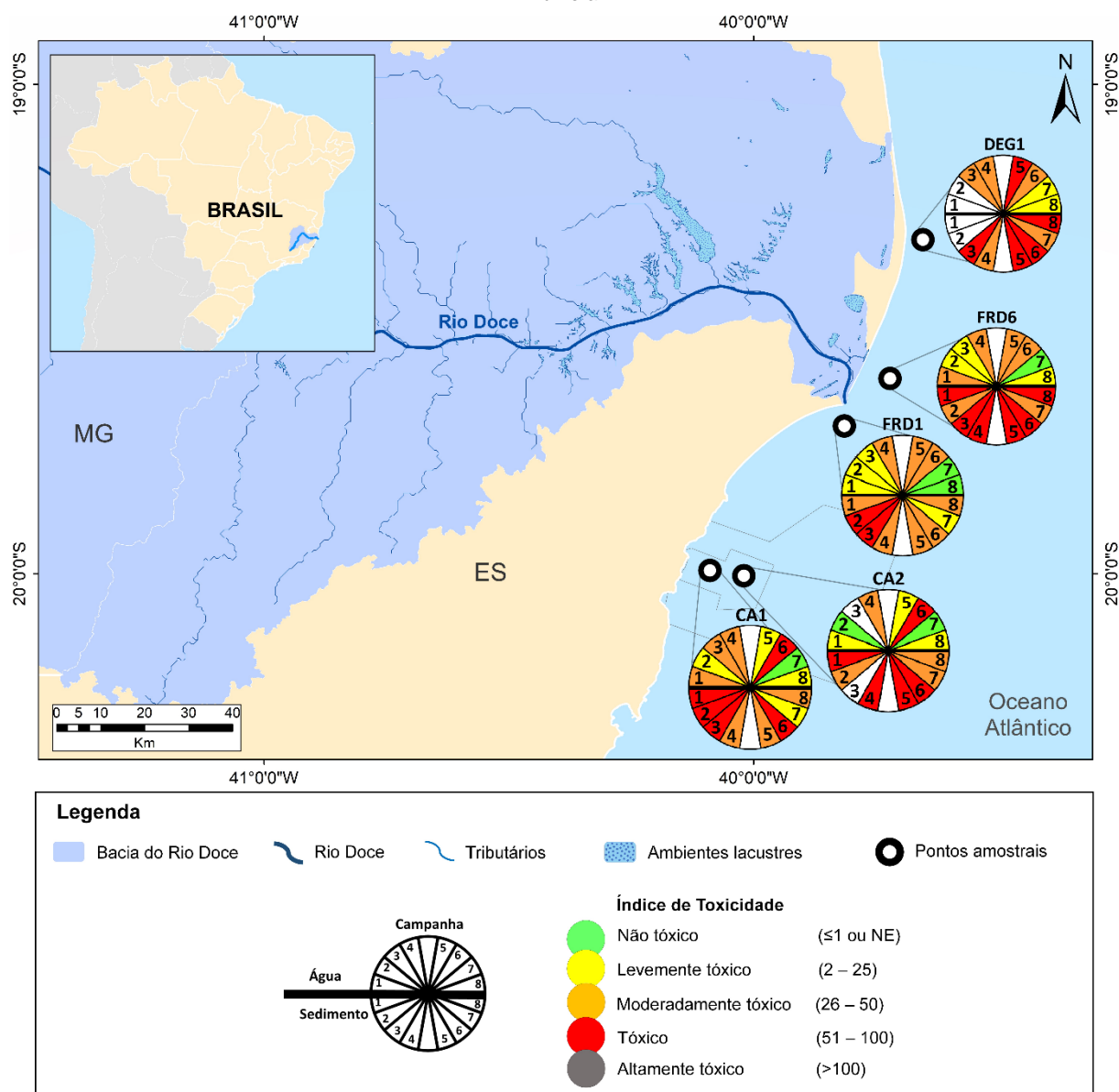
Ponto/Período	Matriz	Ensaio	UT	Severidade	Sensibilidade dos organismos	Valor de toxicidade por ensaio	Classificação por ensaio	Valor médio de toxicidade por matriz	Classificação por matriz	Valor médio de toxicidade por ponto	Classificação por ponto
FRD1/Seco	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	1	1	3	3	LT	1	NT	19	LT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	0	1	3	0	NT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	8	1	3	24	LT	37	MT		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	8	1	3	24	LT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i> (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				
FRD6/Seco	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	1	1	3	3	LT	2	LT	32	MT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	1	1	3	3	LT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	33	1	3	99	T	62	T		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	16	1	3	48	MT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i>	-	-	-	100	T				

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 bruto)									
CA1/Seco	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	2	1	3	6	LT	4	LT	16	LT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	2	1	3	6	LT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	2	1	3	6	LT	28	MT		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	2	1	3	6	LT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i> (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				
	CA2/Seco	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	4	1	3	12	LT	12		
<i>E. lucunter</i> - crônico			8	1	3	24	LT				
<i>P. vivipara</i>			0	2	2	0	NT				
Sedimento		<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	4	1	3	12	LT	40	MT		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	16	1	3	48	MT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i> (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				

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
DEG1/Seco	Água	<i>E. lucunter</i> - agudo	8	1	3	24	LT	12	LT	37	MT
		<i>E. lucunter</i> - crônico	4	1	3	12	LT				
		<i>P. vivipara</i>	0	2	2	0	NT				
	Sedimento	<i>E. lucunter</i> - agudo (elutriato)	33	1	3	99	T	62	T		
		<i>E. lucunter</i> - crônico (elutriato)	16	1	3	48	MT				
		<i>P. vivipara</i> (elutriato)	0	2	2	0	NT				
		<i>Nitokra sp</i> (sedimento bruto)	-	-	-	100	T				

Legenda: UT: unidade tóxica, NT: não tóxica, LT: levemente tóxica, MT: moderadamente tóxica, T: tóxica.

Figura 30: Classificação ecotoxicológica das amostras de água e sedimento coletadas pelo Projeto Ecotoxicologia do 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 %). O código dos pontos amostrais é: Revis Santa Cruz (CA1 e CA2), foz do Rio Doce (FRD1 e FRD6), e Degredo (DEG1). O ponto DEG1 não foi monitorado no Ano 1 do PMBA/Fest, e o ponto CA2 não foi monitorado em set/out de 2019. Por conta da pandemia da COVID-19, não houve monitoramento em ago/set de 2020, representado pelo espaço em branco e, sem



ção, nos gráficos.

Os ensaios de toxicidade com organismos de diferentes níveis da cadeia trófica indicaram que os sedimentos da foz do Rio Doce, REVIS Santa Cruz e região de Degredo continuam impactados do ponto de vista ecotoxicológico. Durante o período chuvoso de 2022 (Campanha 7 - mar 2022), os pontos amostrais localizados ao norte da foz (FRD6 e DEG1), e na Costa da Algas (CA2) se mostraram

como sendo os mais impactados, tendo sido classificados como “moderadamente tóxico”. Contudo, neste mesmo período, ambas as matrizes (água e sedimento) tiveram sua toxicidade reduzida, pelo menos com relação ao período amostral anterior (Campanha 6 - jul/ago 2021). Porém, o sedimento continuou sendo mais tóxico que a água. A toxicidade foi atribuída, principalmente, pelos ensaios de fecundação com ouriço-do-mar e de reprodução com microcrustáceo (copépodo *Nitokra* sp).

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 (mar 2022 – período chuvoso) e na Campanha 8 (set/out 2022 – período seco), bem como nas demais amostras biológicas coletadas durante a 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 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 15469: **Ecotoxicologia aquática – preservação e preparo de amostras**. Rio de Janeiro, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15350: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**. Rio de Jan, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 16181: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – microalgas marinhas**. Rio de Jan, 2013.
- 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: 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(3): 273-283, 1979.

HENRY, R.P. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: DODGSON SJ, TASHIAN RE, GROS G, CARTERS ND (Eds.), *The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics*. **Plenum**, New York, pp. 119-125, 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. 63 – 117.

LOTUFO, G. R.; ABESSA, D. M. S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodes bentônicos. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. G. (Org.). **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 91-97, 2002.

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⁺-K⁺-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-JUNIOR, E., 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.

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

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