

## **TERMO DE REFERÊNCIA 4**

### **PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA**

#### **ANEXO 1 - MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO DOS IMPACTOS CAUSADOS PELA LAMA ORIUNDA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE MARIANA (MG) EM REGIÕES DULCÍCOLAS, ESTUARINAS E MARINHAS.**

##### **1. Contexto:**

Este termo visa definir o monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pelo desastre ocorrido em Mariana (MG), com graves consequências para os ecossistemas dulcícolas, estuarinos e costeiros. Os resultados obtidos nas análises realizadas até o presente momento demonstram a existência de toxicidade crônica bem acentuada, assim como contaminação por metais na água coletada nas diferentes áreas de estudo, sendo que em muitos casos os níveis observados representam concentrações acima dos limites permitidos para as águas de Classe I, conforme definido pela Resolução 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Também foram detectados níveis elevados de bioacumulação corporal de alguns metais, especialmente ferro (Fe), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), nas amostras de zooplâncton e contaminação na maioria das amostras de músculo dos pescados analisados (crustáceos e peixes), acima dos limites permitidos pela legislação vigente, a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº 42, de 29 de Agosto de 2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre "Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos".

Diante deste contexto e considerando os impactos observados este programa de monitoramento tem os seguintes objetivos:

- (1) Investigação dos efeitos causados pela exposição crônica e aguda ao sedimento e à água de regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas, através de testes de toxicidade em laboratório usando organismos como bioindicadores.
- (2) Avaliação das concentrações de metais na água e em organismos aquáticos (água doce, estuarina e marinha) de diferentes níveis da cadeia trófica, incluindo os recursos pesqueiros (peixes e crustáceos), a avifauna, a mastofauna e a herpetofauna aquáticas.
- (3) Análise de biomarcadores de exposição e efeito de metais em organismos aquáticos (água doce, estuarina e marinha) de diferentes níveis da cadeia trófica.
- (4) Avaliação da microbiota e detecção de bioindicadores de impactos ambientais no sedimento e na água na Área Ambiental 1 e na região costeira adjacente à foz do Rio Doce,

bem como em corais de recifes próximos ao sul do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e recifes-controle fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos.

## 1. Áreas de estudo:

A coleta de água, sedimento e organismos deverá ser realizada em duas grandes regiões amostrais: Rio Doce, incluindo a região estuarina, e região costeira adjacente à foz do Rio Doce. A área de abrangência do Rio Doce e suas estações de coleta estão representadas na Figura 1. Por sua vez, a área de abrangência da Região Costeira adjacente à Foz do Rio Doce e suas estações de coleta estão representadas na Figura 2 e Tabela 1, respectivamente.

No momento da realização das coletas, em todas as regiões, deverão ser registrados dados comuns, tais como coordenadas geográficas (datum WGS 84), data, hora e profundidade que foi realizada a amostragem.

Na bacia do Rio Doce serão realizadas coletas em 26 pontos de amostragem (Figura 1) que abrangem locais impactados e não impactados ao longo do Rio Doce, incluindo a região estuarina.

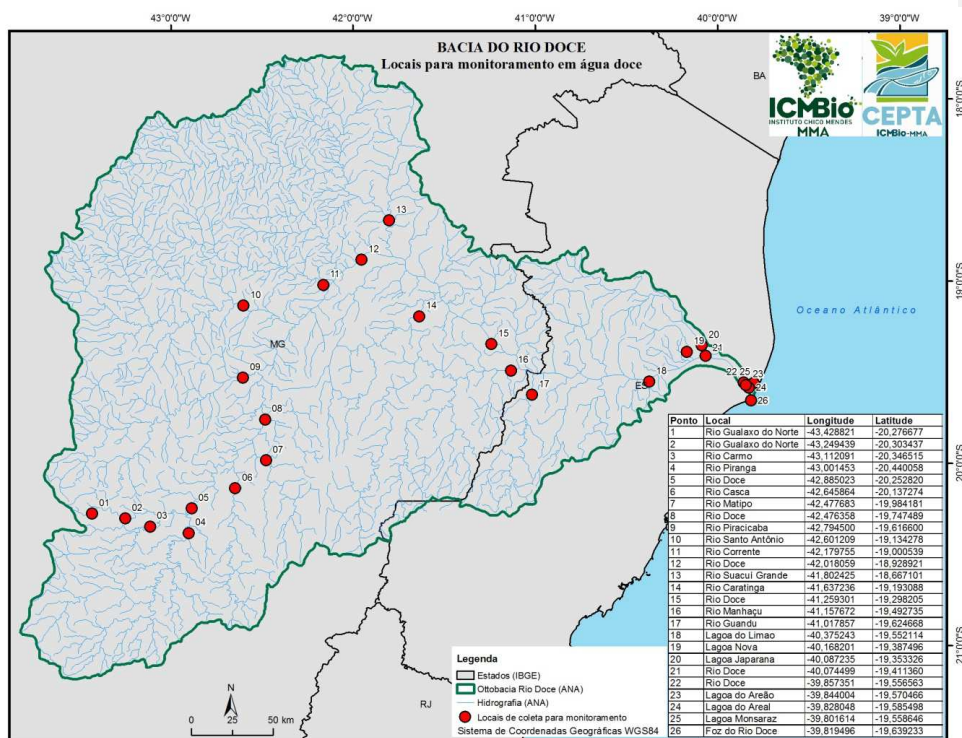


Figura 1. Mapa com os pontos de monitoramento na bacia do Rio Doce.

Na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente, um primeiro conjunto de estações de amostragem deverá contemplar 30 pontos de coleta de amostras (Figura 2; Tabela 1): Região de Abrolhos (3 pontos de amostragem), Itaúnas – Conceição da Barra/ES (2 pontos de amostragem), Barra Nova - São Mateus/ES (2 pontos de amostragem), Degredo – Linhares/ES (2 pontos de amostragem), Foz do Rio Doce – Linhares/ES (6 pontos de amostragem), APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz – Aracruz/ES (11 pontos de amostragem), Vitória/ES (2 pontos de amostragem) e APA de Setiba - Guarapari/ES (2 pontos de amostragem). O objetivo principal das coletas no primeiro conjunto de estações será o de monitorar os parâmetros físico-químicos, investigar efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição crônica e aguda, a contaminação por metais e os efeitos biológicos da pluma de sedimentos a partir da foz do Rio Doce.

O monitoramento das praias adjacentes à desembocadura do Rio Doce deverá ser realizado com coletas de água, sedimentos e biota para investigação dos efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição crônica e aguda, análises da contaminação por metais e resposta de biomarcadores. A área de abrangência do monitoramento químico e biológico das praias ao longo do litoral deverá ser entre os municípios de Aracruz e São Mateus. Deverão ser estabelecidas 10 estações amostrais ao longo deste litoral, conforme indicado na Figura 3 e Tabela 4. As estações ao longo da planície do Rio Doce estarão localizadas na área da Reserva Biológica de Comboios e ao sul, no litoral de Aracruz, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz.

No que se refere às aves, deverão ser monitoradas as tendências nas concentrações de contaminantes em tecidos de aves nas áreas límnicas, estuarinas, costeiras e marinhas potencialmente afetadas pela influência do rompimento da barragem de Fundão em Mariana (MG). Considerando o cenário do impacto em questão, e a heterogeneidade ambiental ao longo das áreas afetadas, deverão ser delimitadas 13 áreas para coleta de amostras visando às análises ecotoxicológicas nas aves, sendo 8 áreas de amostragem distintas ao longo do rio, 1 área em cada um dos ambientes estuarinos, de manguezais e costeiros, e 2 áreas de amostragem marinhas, sendo 1 em Abrolhos e 1 a bordo de embarcações, conforme indicadas na Figura 4 e Tabela 5.

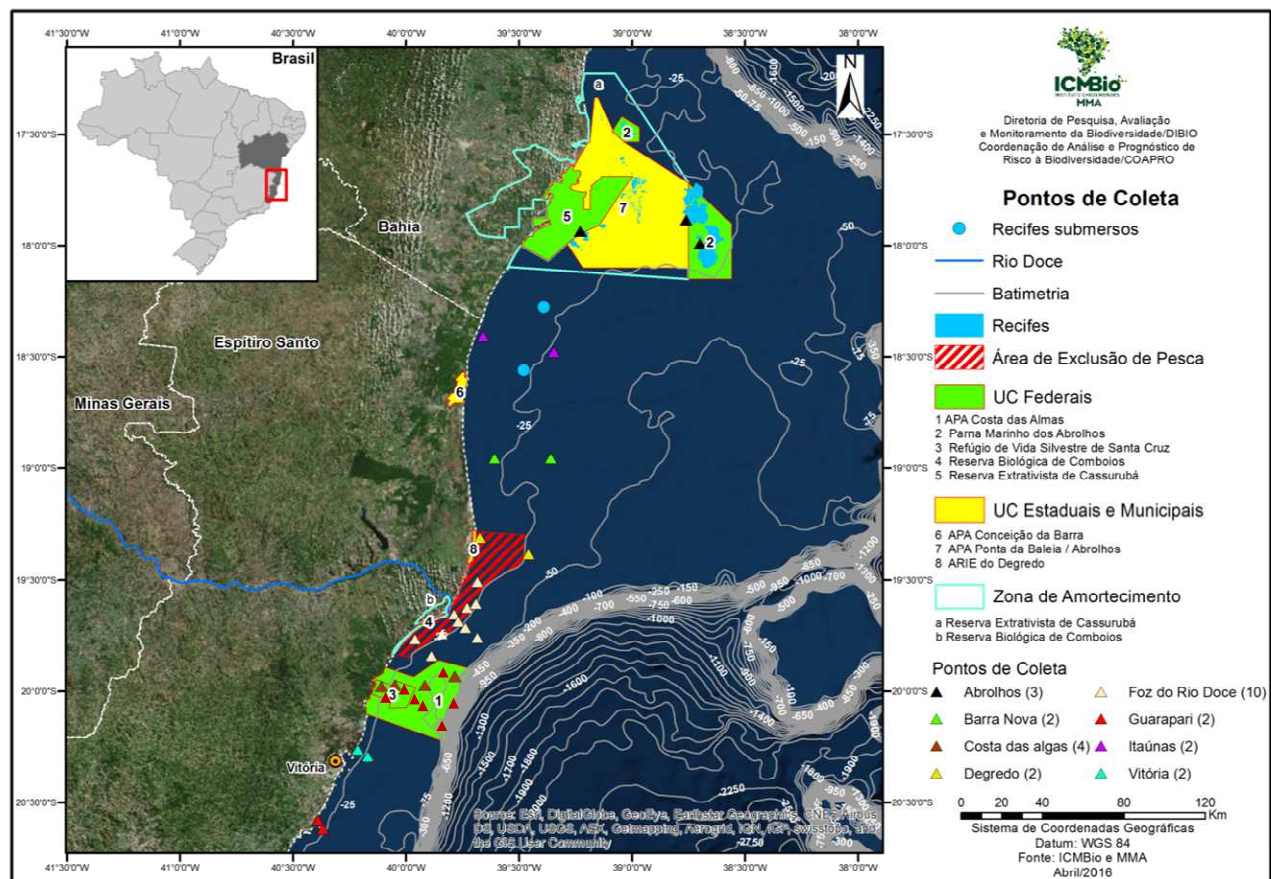


Figura 2. Mapa com os pontos de monitoramento na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de monitoramento na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente.

Localidade	Latitude	Longitude
Vitória	-20,262193	-40,212487
Vitória	-20,293670	-40,168049
Barra Nova	-18,957417	-39,608194
Barra Nova	-18,957417	-39,358639
Abrolhos	-17,991722	-38,697111
Abrolhos	-17,884139	-38,759722
Abrolhos	-17,934861	-39,227222
Itaúnas	-18,408001	-39,658504
Itaúnas	-18,478489	-39,345227
Degredo	-19,308584	-39,671964
Degredo	-19,382999	-39,457405
Foz do Rio Doce	-19,507056	-39,683611
Foz do Rio Doce	-19,605417	-39,689250
Foz do Rio Doce	-19,653167	-39,786389
Foz do Rio Doce	-19,714556	-39,736972
Foz do Rio Doce	-19,840528	-39,886139
Foz do Rio Doce	-19,764722	-39,959694
Costa das Algas	-19,977583	-40,108306
Costa das Algas	-19,973833	-39,915306
Costa das Algas	-20,052502	-40,086248
Costa das Algas	-20,093839	-39,946339
Costa das Algas	-20,143600	-39,886600
Costa das Algas	20,048200	-39,844700
Costa das Algas	-20,008200	-40,034900
Costa das Algas	-19,937900	-39,844000
Costa das Algas	-20,059200	-39,951800
Guarapari	-20,580440	-40,389720
Guarapari	-20,619110	-40,368610

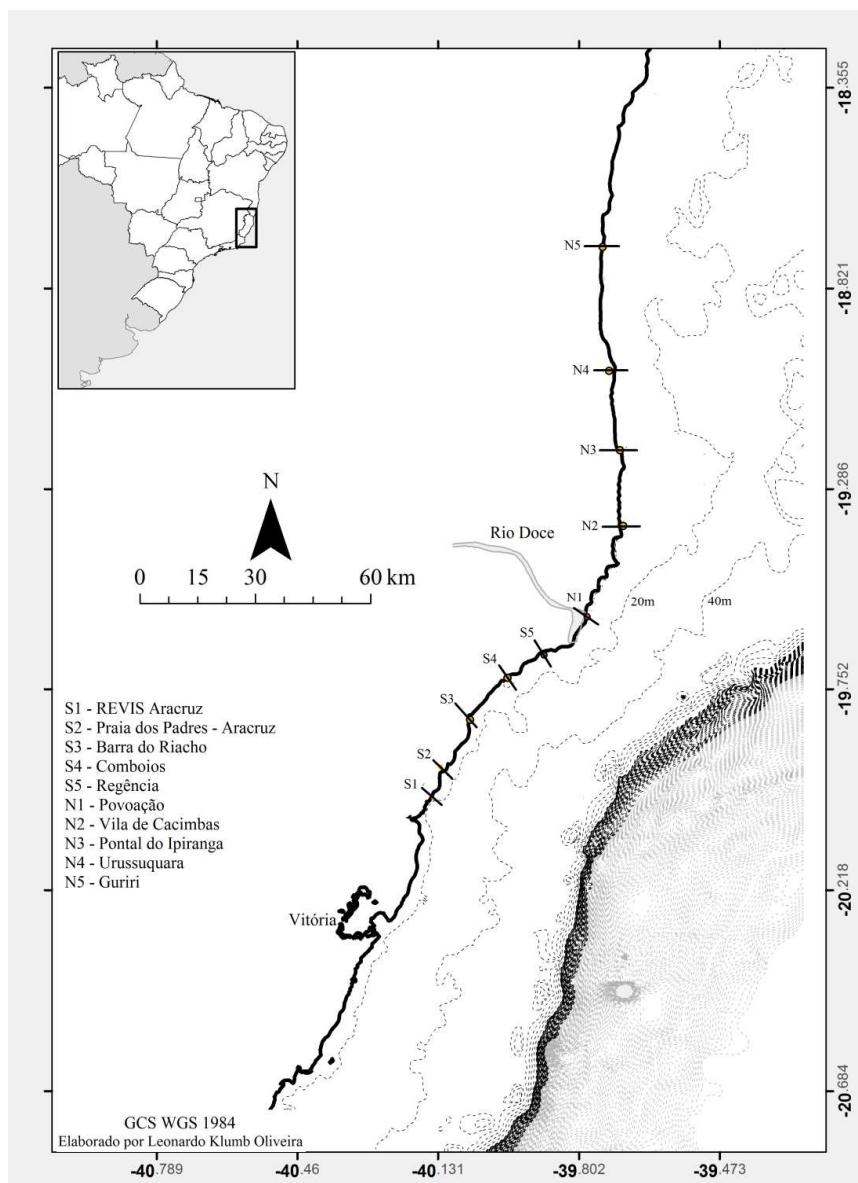


Figura 3. Representação esquemática da área de estudo, indicando as estações amostrais de coleta.



Tabela 2. Localização aproximada das estações amostrais para monitoramento do sistema praial. Coordenadas em UTM (Universal Transverse Mercator System; UTM 0,1km 24k).

Estações	Leste	Sul
Aracruz 1: Refúgio	379908.84	7787892.11
Aracruz 2: Padres	382270.68	7795558.15
Doce Sul 1: Barra Do Riacho	389347.01	7807767.30
Doce Sul 2: Comboios	398484.04	7818545.93
Doce Sul 3: Regência	407416.77	7824460.67
Doce Norte 1: Povoação	417864.00	7834350.00
Doce Norte 2: Vila De Cacimbas	426647.00	7857980.00
Doce Norte 3: Pontal Do Ipiranga	425785.00	7877396.00
Doce Norte 4: Urussuquara	423027.00	7897769.00
Doce Norte: 5 Guriri	421309.00	7929528.00

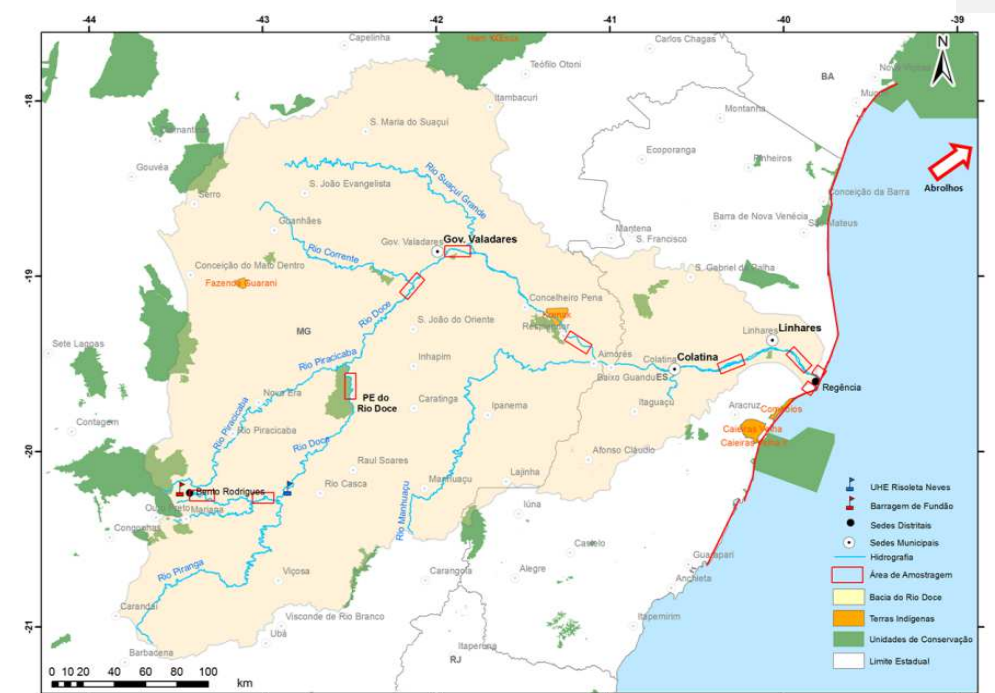


Figura 4. Mapa das áreas de coleta (indicadas em vermelho) de amostras de aves continentais, estuarinas, de manguezais, costeiras e marinhas.

Tabela 3. Áreas onde deverá ser realizado o monitoramento de contaminantes em aves.

<b>Áreas de Amostragem</b>
Rio Gualacho do Norte
Rio do Carmo (trecho afetado)
Rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce)
Rio Doce (à montante da foz do rio Corrente)
Rio Doce (à montante da foz do rio Suaçuí Grande)
Rio Doce (à montante da foz do rio Manhuaçu)
Rio Doce (entre Colatina e Linhares)
Rio Doce (entre Linhares e Regência)
Estuário do rio Doce (Linhares)
Manguezal na foz do rio Doce (Linhares)
Costa adjacente à foz do Rio Doce (norte e sul)
Área marinha (amostragem a bordo)
Abrolhos

### 3. METODOLOGIA E PERIODICIDADE

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

#### 3.1. Amostras de água

Em cada ponto de coleta no Rio Doce (26 pontos de coleta; Figura 1, bem como na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente (21 pontos; Figura 2; Tabela 1), inclusive no ambiente praial (13 pontos; Figura 3; Tabela 2), deverão ser coletadas amostras de água. As coletas de água ao longo da coluna d'água deverão ser realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal de Niskin. Em todos os pontos deverão ser coletadas amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo) para a análise das concentrações de metais (total e dissolvido). As coletas deverão ser realizadas nas seguintes profundidades: superfície (0 a 15 cm da superfície) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo, conforme



profundidade do local de coleta). Em cada local de amostragem deverão ser coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 10 mL cada amostra) de água não filtrada para análise da concentração total de metais. Imediatamente após a coleta, as amostras deverão ser acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO<sub>3</sub>, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas. Em cada local de amostragem deverão também ser coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL cada amostra) de água filtrada (filtro de 0,45 µm de malha) para análise das concentrações de metais dissolvidos e carbono orgânico dissolvido. Imediatamente após a coleta, as amostras deverão ser filtradas, acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO<sub>3</sub>, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas e na ausência de luz. Em todas as amostras de água deverão ser analisados os seguintes metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn) e mercúrio (Hg).

### **3.2. Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água da Foz do Rio Doce e região costeira**

Amostras adicionais além daquelas descritas para a análise química de água deverão ser coletadas para realização dos testes de toxicidade. Para tanto, em todos os pontos de coleta deverão ser coletadas amostras de água superficial e sedimento bruto suficiente para realização de todos os testes previstos no projeto.

Deverá ser utilizado uma série de bioensaios que avaliem diferentes efeitos biológicos (reprodução, fertilização e desenvolvimento) em diferentes vias de exposição (água bruta, sedimento inteiro e elutriato) assegurando a investigação completa de efeitos potenciais em vários níveis tróficos de cada área estudada (regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas). Deve-se dar preferência a organismos nativos específicos de cada região ambiental e com seus procedimentos de ensaio já normatizados e, adicionalmente, bioensaios com zebrafish, como um modelo consagrado para estudos de ecotoxicologia experimental envolvendo ovos, embriões e larvas, não excluindo os ensaios com espécies nativas.

### **3.3. Amostras de biota**

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

Nos ambientes de água doce (Figura 1), deverão ser coletadas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, larvas de quironomídeos, girinos de anfíbios, uma espécie de crustáceo (camarão de água doce), duas espécies de peixes carnívoros (tucunaré e piranha), uma espécie de peixe omnívoro (bagre *Pimelodus maculatus*) e uma espécie de peixe herbívoro

(cascudo). Deverão ser coletadas também as seguintes espécies nativas que ocorrem em toda a bacia: *Hoplias malabaricus*- piscívoro, com uso amplo da coluna d'água, *Hypostomus aff. Affinis*, *Geophagus brasiliensis* e *Astyanax* sp (complexo *A. bimaculatus*) e ainda espécies de interesse comercial: *Prochilodus vimboides*, *Lophiosilurus alexandri*, *Salminus brasiliensis* e *Prochilodus costatus*.

No ambiente estuarino (Figura 1), deverão ser coletadas amostras de fitoplâncton, zooplâncton, uma espécie de crustáceo (camarão) e 4 espécies de peixes (carapicu *Eucinostomus* sp., corvina *Pachyurus adspersus*, bicudo *Pomadasys ramosus* e bagre caçari.

As amostras de fitoplâncton deverão ser coletadas através de arrastos com rede de malha de 60 µm e diâmetro de boca de 60 cm. Por sua vez, as coletas de zooplâncton, de larvas de quironomídeos e de girinos de anfíbios deverão ser realizadas através de arrastos com rede tipo WP-2 de 60 cm de diâmetro de boca e malha de 200 µm. A coleta de crustáceos e peixes deverá ser realizada da forma mais abrangente possível, com utilização dos mais diversos petrechos de pesca (redes de cerco, redes de arrasto, redes de espera, puçás, peneiras, covos e pesca elétrica, quando o ambiente permitir), de acordo com o tipo de ambiente.

Para as análises das concentrações de metais nos organismos do Rio Doce e região estuarina, deverão ser coletadas em cada ponto de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises (5 pools de fitoplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de zooplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de larvas de quironomídeos com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de girinos de anfíbios com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 10 exemplares da espécie de camarão; e 10 exemplares de cada uma das 4 espécies de peixes em estudo). Após a biometria, os crustáceos deverão ser adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo deverá ser coletada por punção hemolinfática e o organismo deverá ser então dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. Após a biometria, os peixes também deverão ser adequadamente anestesiados. O sangue de cada indivíduo deverá ser coletado por punção venosa e o organismo deverá ser então dissecado para a coleta de músculo, brânquias e fígado. As amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes deverão ser imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, conforme será descrito a seguir. As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises das concentrações de metais deverão ser acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Todas estas amostras deverão então ser imediatamente congeladas e transportadas congeladas para o laboratório, onde deverão ser mantidas congeladas em freezer comum até o momento das análises.

Nestas amostras deverão ser analisados os seguintes metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos do Rio Doce e região estuarina, conforme descrito acima, deverá ser também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras devem ser também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores (5 pools de fitoplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de zooplâncton com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de larvas de quironomídeos com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 5 pools de girinos de anfíbios com aproximadamente 0,5 g em cada pool; 10 exemplares de 1 espécie de camarão; e 10 exemplares de cada uma das 4 espécies de peixes em estudo). No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas (crustáceos) ou fígado (peixes) de cada organismo deverão ser coletadas e devidamente acondicionadas, para posterior análise. As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de biomarcadores deverão ser acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para posterior análise de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em animais dulcícolas e estuarinos (composição iônica corporal/hemolinfática/plasmática, atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos), conforme será descrito a seguir.

No caso das águas da Foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Figura 2; Tabela 1), desde que possível, deverão ser coletados os seguintes organismos em cada ponto de coleta: fitoplâncton (coleta com rede de fitoplâncton); zooplâncton (coleta com redes de zooplâncton); hidrocorais (coleta manual por mergulho autônomo); corais (coleta manual por mergulho autônomo); poliquetos (coleta manual após triagem de sedimento coletado com draga); moluscos (coleta manual ou após triagem de sedimento coletado com draga); macrocrustáceos (coleta com rede de arrasto ou armadilha); peixes (coleta com redes de arrasto, emalhe ou outra arte de pesca). As espécies de macrocrustáceos incluirão o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e *F. brasiliensis* e o camarão sete barbas *Xiphopenaeus kroyeri*. Por sua vez, as espécies de peixes deverão incluir o roncador *Conodon nobilis*, a pescadinha *Cynoscion sp.*, o peroá *Balistes capriscus* e o linguado sem mancha.

Para as análises de concentrações de metais nas amostras dos organismos da Foz do Rio Doce e região costeira adjacente deverão ser coletadas, em cada ponto de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises: fitoplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); zooplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com

duração entre 10 e 15 min); hidrocorais (10 fragmentos de *Millepora alcicornis* por ponto de coleta); corais (10 fragmentos de *Mussismilia harttii* por ponto de coleta); poliquetos (10 indivíduos por ponto de coleta); moluscos (10 indivíduos por ponto de coleta); macrocrustáceos (10 indivíduos por ponto de coleta e por espécie); peixes (10 indivíduos por ponto de coleta e por espécie). Após a biometria, os crustáceos deverão ser adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo deverá ser coletada e o organismo deverá então ser dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. Por sua vez, os peixes também deverão ser adequadamente anestesiados. O sangue de cada indivíduo deverá ser coletado e o organismo deverá então ser dissecado para coleta de músculo, brânquias e fígado. As amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes deverão ser imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, conforme será descrito a seguir. As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de metais deverão então ser imediatamente congeladas e transportadas congeladas para o laboratório, onde deverão ser mantidas congeladas em freezer comum até o momento das análises. Nestas amostras deverão ser analisados os metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos da Foz do Rio Doce e região costeira adjacente, conforme descrito acima, deverá ser também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras devem ser também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores: fitoplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); zooplâncton (5 amostras por ponto de coleta, sendo cada amostra constituída de pools de no mínimo 3 arrastos diferentes com duração entre 10 e 15 min); hidrocorais (10 fragmentos de *Millepora alcicornis* por ponto de coleta); corais (10 fragmentos de *Mussismilia harttii* por ponto de coleta); poliquetos (10 indivíduos por ponto de coleta); moluscos (10 indivíduos por ponto de coleta); macrocrustáceos (10 indivíduos por ponto de coleta e por espécie); peixes (10 indivíduos por ponto de coleta e por espécie). No caso dos crustáceos e peixes, as amostras de músculo, brânquias e hepatopâncreas (crustáceos) ou fígado (peixes) de cada organismo deverão ser coletadas e devidamente acondicionadas, para posterior análise. As amostras de tecidos dos crustáceos e peixes deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de biomarcadores deverão ser acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para posterior análise de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

No ambiente praial, deverão ser coletados, nos 13 pontos de amostragem (Figura 3; Tabela 2), os seguintes organismos: 1 espécie de poliqueto (triagem manual do sedimento), 1 espécie de anfípodo (triagem manual do sedimento), o isópodo *Excirolana* sp. (triagem manual do sedimento) e o caranguejo *Ocypode quadrata* (coleta manual).

Para as análises de concentrações de metais nas amostras dos organismos da região praial deverão ser coletadas, em cada ponto de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises: 1 espécie de poliqueto (10 indivíduos por ponto de coleta); 1 espécie de anfípodo (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); isópodo *Excirolana* sp. (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); caranguejo *Ocypode quadrata* (10 indivíduos por ponto de coleta). Após a biometria, os crustáceos deverão ser adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo deverá ser coletada e o organismo deverá então ser dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. As amostras de hemolinfa deverão ser imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, conforme será descrito a seguir. As amostras de tecidos dos crustáceos deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur<sup>®</sup> e enxaguados em água MilliQ. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de metais deverão então ser imediatamente congeladas e transportadas congeladas para o laboratório, onde deverão ser mantidas congeladas em freezer comum até o momento das análises. Nestas amostras deverão ser analisados os seguintes metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos da região praial, conforme descrito acima, deverá ser também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras devem ser também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores: 1 espécie de poliqueto (10 indivíduos por ponto de coleta); 1 espécie de anfípodo (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); isópodo *Excirolana* sp. (5 pools por ponto de coleta; no mínimo 5 indivíduos por pool); caranguejo *Ocypode quadrata* (10 indivíduos por ponto de coleta). As amostras de tecidos dos crustáceos deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de biomarcadores deverão ser acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para análise de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de biomarcadores de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

Nos manguezais, deverão ser coletados os caranguejos guaiamu (*Cardisoma guanhumi*) e caranguejos-uçá (*Ucides cordatus*), de acordo com os pontos de coleta e procedimentos descritos no Anexo 5 do presente Programa de Monitoramento (*Estudo e monitoramento*

*de manguezais - Alterações Ecológicas na Dinâmica dos Manguezais sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce: Barra Nova à Aracruz*). Para os manguezais de franja sobre lateritos do RVS de Santa Cruz, serão coletadas espécies de crustáceos decápodes predominantes naqueles ambientes.

Para as análises de concentrações de metais nas amostras dos organismos de manguezais, deverão ser coletadas, em cada ponto de monitoramento, amostras em quantidades suficientes para a realização das análises: caranguejo guaiamu (10 indivíduos por ponto de coleta) (ver Anexo 5 manguezais); caranguejo-uçá (10 indivíduos por ponto de coleta). Após a biometria, os caranguejos deverão ser adequadamente anestesiados. A hemolinfa de cada indivíduo deverá ser coletada e o organismo deverá então ser dissecado para coleta de músculo, brânquias e hepatopâncreas. As amostras de hemolinfa deverão ser imediatamente preparadas para as análises de biomarcadores de dano no material genético, conforme será descrito a seguir. As amostras de tecidos dos caranguejos deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico, e acondicionadas em frascos plásticos previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de metais deverão então ser imediatamente congeladas e transportadas congeladas para o laboratório, onde deverão ser mantidas congeladas em freezer comum até o momento das análises. Nestas amostras deverão ser analisados os seguintes metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), conforme será descrito a seguir.

Para cada amostra obtida para as análises das concentrações de metais nos organismos de manguezais, conforme descrito acima, deverá ser também coletada uma duplicata da mesma amostra para as análises de biomarcadores nestes organismos. Estas amostras devem ser também coletadas em quantidades suficientes para a realização das análises de biomarcadores: caranguejo guaiamu (10 indivíduos por ponto de coleta); caranguejo-uçá (10 indivíduos por ponto de coleta). As amostras de tecidos dos caranguejos deverão ser coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável. Todas as amostras de todos os organismos coletados para as análises de biomarcadores deverão ser acondicionadas em tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C), para posterior análise de biomarcadores de exposição (concentração de metalotioneínas) e de efeitos de metais em organismos marinhos (atividades enzimáticas, danos oxidativos em biomoléculas e danos morfológicos).

### **3.4. Avaliação da microbiota no sedimento e na água da bacia do Rio Doce e da região costeira**

O monitoramento da comunidade microbiana total em amostras de água, sedimento e associada aos corais, deverá ser realizado utilizando-se triplicatas das amostras em cada ponto de coleta (total de até 12 amostras por ponto de coleta; Figuras 1 e 2; e Tabela 1),



através da extração do DNA total dessas amostras e posterior análise molecular por métodos de fingerprinting e de sequenciamento de DNA, utilizando-se sequenciadores de DNA de nova geração. A análise das sequências obtidas deverá permitir a avaliação do core microbiano e os microrganismos presentes nas diferentes amostras, nos diferentes pontos e nos diferentes tempos de coleta, correlacionando estatisticamente os resultados de diversidade microbiana obtidos com as demais análises realizadas no programa de monitoramento, com concomitante análise de possíveis impactos que estejam presentes em pontos de coleta ao longo do tempo. Essa avaliação deverá permitir não apenas indicar possíveis alterações ambientais temporais e/ou pontuais, como ainda apontar bioindicadores microbianos específicos da presença de sedimentos e/ou de impactos presentes nas diferentes áreas amostradas, que poderiam ser rastreados em áreas adjacentes.

### **3.5. Coleta de amostras de aves**

No que se refere às aves, o monitoramento da bioacumulação de contaminantes deverá considerar as espécies conforme seus diferentes hábitos alimentares/guildas tróficas, a fim de compreender o quadro de contaminação dos organismos e a biomagnificação dos contaminantes ao longo da cadeia trófica. No que se referem às variações temporais, assim como para os demais organismos em avaliação, a frequência de amostragem das aves deverá ser sazonal (inverno e verão). Devido à grande heterogeneidade ambiental ao longo dos 600 km do curso do rio afetados pelo evento não é possível antever quais espécies estarão presentes nas áreas amostrais e assim, definir a amostragem em nível específico. Por isso, deverão ser realizadas coletas de espécies de aves que representem os hábitos alimentares relacionados aos ambientes dulcícola e estuarino, conforme as famílias relacionadas na Tabela 4. Assim, em cada um dos pontos amostrais (Figura 4; Tabela 3) deverá ser coletada uma espécie de cada grupo alimentar, de acordo com a Tabela 4, conforme a sua abundância local e buscando atender à lista de priorização associada.

As espécies que serão capturadas em cada local de amostragem deverão ser selecionadas com base em dados de abundância, priorizando sempre aquelas mais abundantes, a fim de que a coleta não resulte em impactos populacionais e que viabilize a obtenção de amostras das mesmas espécies ao longo de todo o período de monitoramento. Deverão ser obtidas amostras de, no mínimo, dois indivíduos da mesma espécie por área de amostragem, por estação do ano (inverno e verão). Deverá ser priorizada a amostragem não letal, por captura manual ou com rede-de-neblina, ou amostragem de indivíduos encontrados mortos. Deverão ser realizadas amostragens com redes-de-neblina nos diferentes ambientes das áreas pré-definidas, fazendo uso de uma linha de 10 redes de 12 m ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados, visando à obtenção não letal de amostras de 10 indivíduos por local por estação do ano (inverno e verão). Em caso de

ausência da guilda trófica/hábito alimentar, será imprescindível a justificativa baseada em bibliografia especializada e em dados de abundância.

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

Hábito alimentar/guilda trófica	Famílias	Exemplo de espécies a serem priorizadas
Invertebrados aquáticos, ovos e larvas de anfíbios, pequenos vertebrados e de origem vegetal.	Anseridae, Rallidae, Charadriidae, Scolopacidae	<i>Charadrius collaris</i> , <i>Actitis macularius</i> , <i>Aramides saracura</i> , <i>Gallinula galeata</i>
Filtradores, Plantas aquáticas, e invertebrados	Anatidae	<i>Dendrocygna autumnalis</i> , <i>Dendrocygna viduata</i> , <i>Amazonetta brasiliensis</i>
Peixes e invertebrados aquáticos	Podicipedidae, Ardeidae, Cerylidae	<i>Egretta caerulea</i> , <i>Egretta thula</i> , <i>Chloroceryle americana</i>
Piscívoras	Phalacrocoracidae, Sternidae, Rynchopidae, Alcedinidae	<i>Phaetusa simplex</i> <i>Rynchops niger</i>
Malacófagos	Acciptridae*, Aramididae	* <i>Rostrhamus sociabilis</i>

Para os espécimes capturados com rede-de-neblina, deverão ser coletadas as seguintes amostras: sangue (máximo de 1% da massa corporal da ave em microtubo ou frasco de 1,5 ml, sem anticoagulante) e penas de contorno (mínimo de 5 a 10 penas). Em caso de aves abatidas ou encontradas mortas, o sangue poderá ser obtido nos coágulos cardíacos. As amostras de sangue deverão ser resfriadas em campo e congeladas tão logo seja possível. Por sua vez, as penas deverão ser armazenadas a seco em sacos plásticos tipo zip-loc.

Os tipos de amostras a serem obtidos de cada ave coletada devem incluir sangue coagulado, músculo peitoral, fígado, penas de contorno e osso (fêmur). Além disso, para interpretação dos resultados quantitativos de contaminação, é fundamental que sejam obtidas informações de aspectos tróficos de cada ave coletada. Assim, o conteúdo estomacal deverá ter seus itens alimentares analisados e quantificados (identificação taxonômica dos itens alimentares e quantificação da frequência de ocorrência absoluta e relativa; FO e FO%, respectivamente), contribuição numérica absoluta e relativa (N e N%, respectivamente) e contribuição em massa medida com balança de precisão ou

reconstituída, absoluta e relativa (M e M%, respectivamente). Os parâmetros para análise de conteúdo estomacal estão definidos em Faria *et al.* (2016).

A interpretação dos dados de bioacumulação de contaminantes ao longo da cadeia trófica requer a análise simultânea de isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) nos tecidos dos mesmos indivíduos amostrados. Assim, uma alíquota do sangue (5-6 gotas) e de pena em crescimento (5-6 penas), ou seja, ainda com bulbo contendo sangue, deverá ser analisada quanto aos isótopos estáveis. Para comparação com os valores isotópicos das aves, deverão ser obtidas amostras de tecido de pelo menos 3 itens alimentares de cada espécie de ave, indicadas a partir da análise do conteúdo estomacal e/ou observações de forrageamento em campo e literatura pertinente. A preparação e análise das amostras de aves e suas potenciais presas seguirá os protocolos descritos em Faria *et al.* (2016). Os dados isotópicos serão analisados através de modelos bayesianos de misturas isotópicas, também conforme descritos em Faria *et al.* (2016).

Para as aves que serão abatidas, deverão ser coletadas amostras de sangue, músculo, fígado, penas e osso de 2 indivíduos, de 2 espécies de cada guilda trófica, conforme indicado na Tabela 4, em cada uma das 13 localidades indicadas para o monitoramento (Figura 4; Tabela 3). No caso das coletas não serem letais, deverão então ser amostrados somente sangue e penas, porém de 10 indivíduos. Assim, deverão ser abatidas no máximo 20 aves em cada uma das 13 localidades, sendo amostrados 5 tecidos cada indivíduo. Porém, deve ser priorizada a amostragem não letal. Neste caso, serão coletadas amostras de penas e sangue, sendo que um número maior de indivíduos (10) será amostrado, mantendo-se assim o número total de amostras de penas e sangue, independente do método de coleta.

Os dados de concentrações de metais nas penas e no sangue de aves marinhas deverão ser comparados com amostras de 10 indivíduos por espécie que tenham sido coletados previamente ao evento de rompimento da barragem.

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

Após o recebimento de informação sobre encalhe de algum cetáceo ou tartaruga marinha nas praias do litoral norte capixaba, prontamente deverão ser realizadas visitas ao local para a obtenção das seguintes informações: condição climática e de maré, localização exata com GPS, identificação da espécie, existência de marcas de aparatos de pesca, registro fotográfico, medições dos animais e coleta de material biológico. O monitoramento das praias deverá ser realizado em parceria com os programas de

monitoramento associados às exigências de Órgãos Ambientais Federais nas áreas onde estes estiverem atuando durante o período do monitoramento.

A equipe de resgate deverá ir até o local e avaliar a situação. Em se tratando de animal vivo, um médico veterinário deverá realizar os primeiros-socorros e procurar orientar o procedimento de devolução do animal ao mar. Em se tratando de um animal morto de até 3 m de comprimento, a carcaça deverá ser colocada no carro de resgate e removida para a base de instituições mais próximas que desenvolvam pesquisas relacionadas (preferencialmente em andamento). Caso o animal tenha mais de 3 m, o exame da carcaça e a coleta de material deverão ser realizados no local do encalhe. Os procedimentos de resgate e necrópsia de baleias e golfinhos deverão seguir o Protocolo de Conduta para Encalhes de Mamíferos Aquáticos da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste (REMANE, 2005). Todos os animais deverão receber um número de registro, sendo que este número deverá ser utilizado para identificar as amostras biológicas coletadas.

Conforme o estado da carcaça, deverão ser coletados os dados biométricos e realizada a necrópsia, a fim de se estabelecer a causa da morte. Durante as necrópsias, deverão ser registrados os dados biológicos dos exemplares amostrados. Deverão ser obtidos dados referentes à classificação taxonômica, comprimento total, peso, medidas alométricas, sexo, estágio de maturação, estado da carcaça e marcas de interação com artefatos de pesca. A carcaça deverá ser fotografada, posteriormente descarnada e os ossos coletados e acondicionados para maceração. Amostras de tecidos para análises de DNA também deverão ser coletadas.

Todos os dados coletados deverão ser registrados em fichas padronizadas, armazenados em um banco de dados e devidamente interpretados. O material osteológico coletado deverá ser examinado, buscando-se evidências de alterações patológicas. A limpeza do material osteológico deverá ser realizada através da técnica de maceração, para posterior tombamento nos acervos de instituições de pesquisa (preferencialmente locais).

Um fator limitante para a adequada execução dos procedimentos descritos acima é o avançado estado de decomposição no qual muitos animais chegam às praias. O estado de decomposição das carcaças limita o tipo de amostras que podem ser coletadas e o tipo de análises que podem ser realizadas. Portanto, as carcaças deverão ser classificadas em códigos de 1 a 5, seguindo-se o padrão proposto por Geraci e Lounsbury (2005), onde 1 corresponde ao animal vivo e 5 a restos de esqueleto ou carcaça mumificada.

Nas amostras de tecidos de quelônios e cetáceos deverão ser realizadas as análises de microcontaminantes e metais. Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), as amostras frescas (cerca de 0,4 g de músculo, 0,2 g de fígado e 0,2 g de rim) deverão ser tratadas a frio com 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após essa etapa, deverão ser adicionados 5 mL de solução sulfonítrica concentrada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub>; v/v) e as amostras deverão então ser aquecidas em banho-maria a 60°C por 2 h, até a solubilização completa da amostra. Os extratos deverão ser resfriados por 15 min, e 10 mL de KMnO<sub>4</sub> (5%) deverão ser adicionados aos extratos. As amostras deverão retornar ao banho-maria (60°C) por 15 min, e deverão então ser resfriadas em repouso, por uma noite. No dia seguinte, o extrato deverá ser reduzido com a adição de 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (HONH<sub>3</sub>) a 12%. O extrato final deverá ser avolumado com água Milli-Q até 14 mL. As leituras deverão ser realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica com gerador de vapor frio. A certificação do método de determinação do HgT deverá ser feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de peixe) e DORM-4 (músculo de peixe) do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC). Todas as amostras deverão ser analisadas em duplicata. Além disso, deverão ser usados brancos analíticos em todas as baterias analíticas.

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

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

qualidade deverá ser realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

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

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



### **3.7. Amostras de sedimento**

Em cada ponto de coleta no Rio Doce (Figura 1), bem como na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Figura 2, Tabela 1), inclusive no ambiente praial (Figura 4, Tabela 3), deverão ser coletadas amostras de sedimentos com auxílio de pá ou draga do tipo Van Veen, dependendo do local de coleta. Em cada local de amostragem (26 pontos no Rio Doce, 21 pontos na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente, e 13 pontos na região praial), deverão ser coletadas 4 amostras de sedimento. As amostras deverão ser abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento. As amostras deverão ser fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento. Para a análise de metais, as amostras deverão ser coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5 cm) da amostra de sedimento, obtendo-se assim apenas o sedimento superficial. Para cada amostra, deverão ser coletados aproximadamente 10 g de sedimentos, os quais serão armazenados em pote plástico e mantidos congelados até o momento das análises. Em todas as amostras de sedimento deverão ser analisados os seguintes metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

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

No momento da coleta das amostras de água, deverão ser realizadas as medidas da temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetros. Por sua vez, a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) deverá ser determinada nas amostras de água filtradas (0,45 µm de malha), utilizando-se um analisador de carbono total (TOC). A concentração de sulfatos deverá ser realizada utilizando-se método turbidimétrico com leitura em espectrofotômetro a 420 nm (Tabatabai, 1974). A alcalinidade total deverá ser determinada por titulação com solução padrão ácida, utilizando-se método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (Ca, K, Mg e Na) da água deverá ser determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. Por sua vez, a concentração de cloretos deverá ser analisada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Com base nos resultados obtidos para as amostras de água doce, deve ser realizada a modelagem ecotoxicológica dos dados visando a previsão da biodisponibilidade e toxicidade de metais nos diferentes ambientes dulcícolas, utilizando-se o Modelo do Ligante Biótico (BLM) versão 2.2.3.

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

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

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

As amostras de material biológico deverão ser previamente secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) ultrapuro (Suprapur, Merck) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. O teor de água para cada amostra deverá ser obtido. As amostras deverão então ser submetidas à

digestão ácida lenta em tubos plásticos tipo Eppendorf, os quais deverão estar devidamente lacrados e serem mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até a completa digestão das amostras. As amostras contendo o material biológico digerido deverão então ser avolumadas a 1 mL com água tipo Milli-Q. No momento das análises, caso necessário, as amostras deverão ser diluídas utilizando-se água tipo Milli-Q, visando se adequar as concentrações dos metais nas amostras àsquelas presentes nas soluções padrões certificadas utilizadas para calibrar o equipamento. As concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de material biológico, preparadas conforme descrito acima, deverão ser analisadas, em triplicata, utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica de alta resolução. Por sua vez, a análise da concentração de Hg nestas amostras deverá ser realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica. As concentrações dos metais no material biológico deverão ser expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e µg/g de peso seco (mg/kg de peso seco). Os resultados das amostras de músculo de crustáceos e peixes deverão ser comparados com os limites estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº 42, de 29/08/2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, deverão ser realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, deverão ser analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras deverão ser igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, deverão ser analisados materiais de referência certificados para análise de metais traços do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC), de acordo com o material biológico analisado (DOLT-5: fígado de peixe; DORM-4: músculo de peixe; TORT-3: hepatopâncreas de lagosta). Amostras destes materiais deverão ser tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico coletado no monitoramento, conforme descrito anteriormente. Os percentuais de recuperação dos metais presentes nos materiais de referência certificados, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os metais analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, e Zn), deverão ser apresentados.

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

material deverão ser tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras de sedimento coletadas no monitoramento, conforme descrito anteriormente. Os percentuais de recuperação dos metais presentes no material de referência certificado, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os metais analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, e Zn), deverão ser apresentados.

### **3.10. Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes**

#### **3.10.1. Concentração de metalotioneínas**

A determinação da concentração de metalotioneínas deverá ser realizada conforme metodologia descrita por Viarengo *et al.* (1997). O material biológico deverá ser homogeneizado e centrifugado a 6.000 xg durante 10 min. O sobrenadante deverá ser descartado e o precipitado obtido deverá ser homogeneizado com 1 mL de etanol 87% e clorofórmio 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM). A seguir, a solução resultante deverá ser centrifugada a 6.000 xg durante 10 min. O sobrenadante deverá ser novamente descartado, sendo que o novo precipitado obtido deverá ser homogeneizado em 150 µL de NaCl (250 mM) e serão adicionados posteriormente 150 µL de solução de EDTA (4 mM) e HCl (1 N). A seguir, 100 µL de cada amostra (em duplicata) deverão ser adicionadas a 1,4 mL de solução de DTNB preparada em um tampão (pH 8,0) contendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (200 mM), NaCl (2 M) e DTNB (0,43 mM). Após nova centrifugação a 3.000 xg por 5 min, 350 µL do sobrenadante obtido a partir de cada amostra será então transferido, em duplicata, para as poças de uma microplaca. A leitura de absorbância deverá ser feita em espectrofotômetro de microplacas a 405 nm. Os resultados deverão ser expressos em µmol GSH/g de peso úmido de tecido.

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

Para a determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados deverão ser coletados, rapidamente (30 s) lavados em água tipo MilliQ, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa (70°C), deverá ser determinado o peso seco do material digerido e este digerido em ácido nítrico 65% (SupraPur, Merck). Após completa digestão, as amostras deverão ser apropriadamente diluídas para a análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), as quais deverão ser determinadas por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. Por sua vez, a concentração de cloretos deverá ser analisada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Os resultados deverão ser expressos em mg/g de peso úmido. No que se refere à composição

iônica hemolinfática e plasmática, esta deverá ser analisada nas amostras de hemolinfa (crustáceos) e sangue (peixes) coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As análises dos íons (Ca, K, Mg, Na e Cl) deverão ser realizadas, conforme descrito para a análise da composição corporal.

### ***3.10.3. Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase***

As amostras de material biológico para a determinação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase serão preparadas com base nos procedimentos descritos por Péqueux e Chapelle (1982). As amostras, coletadas conforme descrito acima, deverão ser homogeneizadas num meio contendo 1 mL de tampão SI (sacarose - Imidazol em pH 7,6) e mantidas em banho de gelo. Após deverão ser centrifugadas a 5.000 rpm e a 5°C, por 5 min. O sobrenadante obtido deverá ser coletado para determinação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, a qual deverá ser determinada utilizando-se um método colorimétrico. Para tal, deverão ser usados 100 µL do sobrenadante do homogeneizado, onde deverão ser adicionados 2,5 mL de uma solução salina A contendo 77 mM de NaCl; 20 mM de KCl; 6 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 3 mM de ATP. O pH da solução deverá ser ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras deverão ser incubadas durante 60 min a 25°C, no escuro e a leitura deverá ser feita a 620 nm. A mesma reação deverá ser realizada com 100 µL de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina B contendo 83 mM de NaCl; 6 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína. Ambas as reações deverão ser mantidas por 1 h, quando então serão inibidas pela adição de ácido tricloroacético 50%. A quantidade de fósforo produzido em cada reação deverá ser determinada utilizando-se um kit de reagentes específicos para a determinação do fósforo. A diferença na produção de fósforo entre as duas reações realizadas acima deverá então ser considerada como sendo aquela atribuída à atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A concentração da proteína no homogeneizado deverá ser determinada colorimetricamente, com base no método de Bradford, usando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade da enzima será então expressa em µmoles Pi/mg proteína/h.

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

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

A determinação da atividade da anidrase carbônica deverá ser realizada medindo-se a redução de pH associada à catálise da hidratação do CO<sub>2</sub>, com a correspondente liberação de H<sup>+</sup> (Henry, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras deverá ser constituído de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritiotreitol (DTT 1 mM). Para isso, 15 µL do homogeneizado deverão ser 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, deverão ser adicionados 280 µL de substrato (água destilada saturada com CO<sub>2</sub>) e o pH registrado a cada 5 s, durante 30 s, com o auxílio de um pHmetro de bancada. Paralelamente, deverão ser realizadas determinações do "branco de reação", onde 15 µL do tampão de homogeneização deverão ser adicionados à solução de reação e ao substrato. Deverá ser utilizado o modelo de regressão linear (variável dependente: pH, variável independente: tempo) para determinar a declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos a partir dos homogeneizados será a taxa de reação catalisada, enquanto a média dos dados obtidos nos brancos indicará a taxa da reação não catalisada. Os resultados deverão ser normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e expressos em unidades de anidrase carbônica/mg proteína.

Para a determinação das atividades da Ca<sup>2+</sup>-ATPase e da Mg<sup>2+</sup>-ATPase deverá ser utilizando-se o método descrito por Vajreswari *et al.* (1983), com modificações. O homogeneizado da amostra deverá ser 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 deverá ser centrifugado (20 min, 10.000 xg, 4°C) e 20 µL do sobrenadante deverão ser utilizados para a análise. O meio de reação utilizado na análise da atividade da Ca<sup>2+</sup>-ATPase deverá ser composto por NaCl (189 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), CaCl<sub>2</sub> (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação deverá ser realizada a 30°C, por 30 min. Por sua vez, o meio de reação utilizado na análise da atividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase deverá ser composto por NaCl (189 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), EGTA (0,2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação deverá ser realizada a 30°C, por 30 min. No início da incubação, ATP (3 mM) e ouabaina (1 mM) deverão ser adicionados aos meios de reação. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação deverá ser determinada utilizando-se o método colorimétrico (630 nm). Os resultados deverão ser normalizados com base na quantidade de proteínas totais presente nos homogeneizados e deverão ser expressos em mM Pi/mg proteína/min.

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

As atividades da lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) deverão ser analisadas em homogeneizados das amostras das brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima. Os homogeneizados das



amostras de brânquias e fígado deverão ser realizados por maceração mecânica em mistura contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton x 100. Após centrifugação, o sobrenadante obtido deverá ser utilizado para as análises para análise das atividades da LDH e MDH. A avaliação da atividade da LDH deverá ser realizada pela mistura de solução de piruvato de sódio (1 mM), KCl (100 mM), tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e NADH (250 µM) a uma alíquota do sobrenadante de cada homogeneizado de brânquia ou fígado. Para a determinação da atividade da MDH, deverão ser adicionados à alíquota do sobrenadante dos homogeneizados uma solução de ácido oxaloacético (0,4 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM), NADH (150 µM) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas deverão ser aqueles descritos por Thuensen *et al.* (2005) e Childress e Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, e adaptada por Ribeiro *et al.* (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas em análise deverá ser determinada por espectrofotometria UV em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados deverá ser realizada pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas deverão ser expressas em U/mg de proteína.

#### **3.10.6. Atividades de enzimas antioxidantes**

As atividades da catalase e da superóxido dismutase deverão ser analisadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no item 3.10.5. A atividade da catalase deverá ser determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), conforme metodologia descrita por Beutler (1975). Por sua vez, a atividade da superóxido dismutase deverá ser analisada medindo-se o grau de redução do citocromo C, conforme descrito por McCord e Fridovich (1969). A dosagem de proteínas dos homogeneizados deverá ser realizada pelo método de Bradford. A atividade da catalase deverá ser expressa em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg proteína/min. Por sua vez, a atividade da superóxido dismutase deverá ser expressa em U/mg de proteína.

#### **3.10.7. Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica (LPO) será determinada nas amostras do material biológico utilizando-se o método fluorescente baseado nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Oakes e van Der Kraak (2003). Este método quantifica os danos em lipídios por meio da reação do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação ocorre em condições de acidez e alta temperatura (95°C), gerando um cromógeno fluorescente. Para serem analisadas, as amostras deverão ser homogeneizadas (1:9; peso:volume) utilizando-se uma solução tampão. A fluorescência gerada (emissão: 520 nm; excitação: 580 nm) deverá ser medida utilizando-se um espectrofluorímetro. Os dados deverão ser calculados com base em uma curva construída com soluções padrões de tetrametoxipropano (TMP), que após hidrólise gera MDA. Os resultados deverão ser normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, o qual deverá ser determinado utilizando-se o método de Bradford. Os dados deverão ser expressos em nmol MDA/mg proteína.

### **3.10.8. Oxidação de proteínas**

Os danos oxidativos em proteínas deverão ser analisados utilizando-se o método descrito por Dalle-Donne (2003). Portanto, para quantificar a concentração de proteínas carboniladas nas amostras biológicas deverão ser utilizadas as técnicas de eletroforese unidimensional e de ensaio imunológico por "Western blotting". Neste caso, a detecção das proteínas carboniladas envolve a derivatização do grupamento carbonil com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), a qual leva à formação de um produto estável, a 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP). Antes da derivatização, o conteúdo de proteínas da amostra deve ser padronizada em 0,2 mg/ml de homogenizado, visando normalizar as amostras para a realização do ensaio de eletroforese (SDS-PAGE) e "Western blotting". No processo de derivatização, as proteínas reagem com DNPH em uma solução contendo 12% SDS e uma solução de DNPH/TFA [20 mM DNPH em 20% (v/v) de TFA (ácido trifluoroacético)]. Adicionalmente, três amostras deverão servir como controle positivo, as quais deverão conter 1, 2 e 4 mM de  $H_2O_2$  para induzir o dano oxidativo na amostra. Após incubação por 15 min na temperatura ambiente, a mistura de reação deve ser neutralizada com uma solução 2M de Tris-Base contendo 30% de gliceraldeído. Para cada amostra, as proteínas derivatizadas com DNPH deverão ser separadas para eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12% (1D SDS-PAGE), eletroprecipitadas em membranas de PVDF e submetidas ao ensaio imunológico para determinação do conteúdo de proteínas carboniladas com um anticorpo anti-DNP (Invitrogen, EUA). As bandas obtidas deverão ser visualizadas utilizando-se um kit de reagentes para imunodeteção colorimétrica (Invitrogen, EUA). A densidade das bandas obtidas deverão ser analisadas para cada amostra após escaneamento da membrana de PVDF. Os resultados deverão ser expressos em pixels de densidade ótica.

### **3.10.9. Dano de DNA**

Para a análise de danos oxidativos no material genético, o DNA genômico de cada amostra deverá ser isolado utilizando-se um kit de reagentes para isolamento de DNA (PromoKine, Promocell, Heidelberg, Alemanha). Por sua vez, a análise de danos oxidativos no DNA deverá ser realizada com base na identificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP). Os sítios AP deverão ser medidos utilizando-se uma sonda capaz de reagir com o grupo aldeído destes sítios, a qual deverá ser detectada por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para tal, deverá ser utilizado um kit de reagentes de detecção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (Promokine, Promocell, Heilderg, Alemanha). Os resultados deverão ser expressos em sítios AP/mg de proteína, considerando a concentração de proteínas nas amostras, a qual deverá ser determinada utilizando-se o método de Bradford.

Além da avaliação do dano no material genético através da identificação de sítios AP, conforme descrito acima, este tipo de dano também deverá ser acessado através dos testes dos ensaios do vermelho neutro, micronúcleos e cometa, utilizando-se as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes, coletadas conforme descrito acima.

O ensaio do vermelho neutro deverá ser realizado com os hemócitos presentes nas amostras de hemolinfa dos crustáceos (camarões e caranguejos) coletados nas diferentes áreas do monitoramento. Antes da coleta, as lâminas para microscopia (76 x 26 mm) deverão ser pré-lavadas (1ª lavagem com água e detergente neutro a 5%; 2ª lavagem com água corrente; 3ª lavagem com solução de água destilada saturada com HCl; e 4ª lavagem com água destilada em abundância) e secas, com o tratamento de uma de suas faces com solução de poly-L-lisina em água destilada (1:10), para a adesão dos hemócitos vivos em sua superfície. Para isso, 10 µL dessa solução deverá ser pingada sobre uma das laterais da lâmina, com uma micropipeta monocal, realizando um esfregaço com lâmina e posterior disposição ar para secagem. A diluição da hemolinfa dos crustáceos deverá ser efetuada com solução fisiológica específica para a espécie alvo. A solução estoque de vermelho neutro (duração máxima de três semanas, sob-refrigeração), consistirá da dissolução de 0,0228 g deste corante em 1 mL de DMSO (dimetil-sulfóxido), com posterior preparo da solução de trabalho de vermelho neutro (10 µL solução estoque + 5 mL de solução fisiológica), devidamente homogeneizada com agitador magnético por 1-2 min. Também deverá ser preparada uma solução anticoagulante (2,05 g glicose; 0,8 g de citrato de sódio; 0,42 g de cloreto de sódio; em 100 mL de água destilada), diluída com solução fisiológica na proporção 2:1 (0,334 mL de solução anticoagulante + 0,166 mL da solução fisiológica). Com uma seringa hipodérmica (1 mL) munida de agulha 21 gauge (impede a destruição dos hemócitos e a formação de coágulos), 0,7 mL dessa solução anticoagulante deverá ser aspirada, devendo ser então completada com 0,3 mL de hemolinfa do crustáceo, colhida na membrana de articulação carpo-propodal do quelípodo maior. O conteúdo deverá ser transferido para tubo siliconado (2 mL) e mantido em descanso (15 min), para minimizar a força de adesão e, conseqüentemente, evitar o rompimento dos hemócitos e a coagulação. Posteriormente, 40 µL dessa solução (hemolinfa do animal + solução fisiológica + solução anticoagulante) deverá ser retirada com micropipeta, com substituição da ponteira para cada amostra que está sendo analisada, evitando-se assim a contaminação da mesma. Este volume deverá ser disposto ao centro da lâmina de microscopia previamente tratada com poly-L-lisina, as quais deverão ser em seguida mantidas em câmara úmida escura (15 min), para uma melhor aderência celular. Deverão ser pipetados então 40 µL da solução de trabalho de vermelho neutro sobre cada lâmina, com este volume sendo homogeneizado aos 40 µL de hemolinfa ali já existentes, utilizando-se para tal a ponteira da micropipeta, com posterior cobertura por lamínula. As lâminas deverão ser mantidas em câmara úmida escura (15 min) para a penetração do corante nos hemócitos. Na primeira hora, as lâminas deverão ser examinadas em microscópio óptico a cada 15 min e, caso necessário, a cada 30 min na segunda hora. As células deverão ser focadas em menor aumento (50X), com posterior elevação da magnificação para 400 ou 500X, caso necessário. No momento da observação das lâminas, a luz incidente deve ser a mais reduzida possível, pois o corante é foto-lábil. As células deverão ser cuidadosamente examinadas, com anotação das

anormalidades estruturais, bem como o tempo de retenção do vermelho neutro. Para esta última observação, deverá ser estimada a proporção de células com “vazamento” lisossomal para o citossol, bem como as anormalidades no tamanho/cor dos lisossomos. Na avaliação temporal das lâminas, será utilizado o sinal “+” quando <50% das células apresentarem o citossol claro e ausência de anormalidades estruturais ou estresse; o sinal “±” quando entre 50 a 75%; e o sinal “-” quando >75%.

Para a avaliação do dano no material genético através do ensaio de micronúcleo deverão ser utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As amostras deverão ser coletadas com seringas (1 mL), munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos aos hemócitos. As amostras deverão ser transferidas para tubos siliconizados, que serão dispostos em microcentrífuga (1.000 rpm, por 5 min), com retirada de 50 µL com micropipeta, colocada junto ao fundo do tubo. Este volume de material deverá ser gotejado na lateral da lâmina, sendo então espalhado por esfregação com outra lâmina. O procedimento deverá ser realizado individualmente, com a obtenção de três lâminas/indivíduo, as quais deverão ser secas ao ar e fixadas com solução de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético), por cerca de 20 min, com nova secagem à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas deverão ser coradas com solução de Giemsa 2%, preparada em tampão fosfato pH 8,0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), também por 20 min. Após este procedimento, as lâminas deverão ser lavadas com água deionizada, secas ao ar e com adesão de lamínulas com Entellan® (Merck). Posteriormente, as lâminas deverão ser examinadas sob microscópio óptico comum, integrado a um sistema de análise de imagens por computador, com contagem das células micronucleadas pelo programa KS300® (Carl Zeiss, Alemanha). As três lâminas de cada indivíduo deverão ser avaliadas em aumento de 1.000X, com avaliação de 1.000 hemócitos em cada lâmina, devendo ser então quantificado o número de células micronucleadas por 1.000 células analisadas (MN%).

Para avaliação do dano no material genético através do ensaio cometa deverão ser utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. Alíquotas das amostras deverão ser misturadas a 100 µL (0,5%) de agarose com baixo ponto de fusão, diluídas em tampão fosfato (342 mM NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,7 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e 16 mM KCl (pH 7,6; 780 mOsmol/kg), que deverão ser colocadas sobre lâminas previamente preenchidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobertas por lamínulas e mantidas sob refrigeração até atingirem estado sólido (5-7 min). Após este período, as lamínulas deverão ser retiradas e colocadas em solução de lise gelada pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 10% DMSO, 1% TRITON X-100), por no mínimo 1 h. Após este período, as lâminas deverão ser lavadas e mergulhadas em uma cuba com tampão alcalino de eletroforese pH>13 (10 M NaOH, 200 mM EDTA), para desnaturação do DNA (15 min). A eletroforese deverá ser realizada sob 1V/cm e 300mA (15 min), em gelo, com posterior lavagem das lâminas em tampão de neutralização pH 7 (0,4 M Tris), por igual tempo, com posterior fixação em etanol (10 min). Deverão ser examinadas 100 células/lâmina, com duas lâminas/indivíduo, onde os “cometas” serão categorizados quanto à extensão da

migração do DNA (variável qualitativa): (0) sem dano; (1) ligeiramente danificado; (2) moderadamente danificado; (3) muito danificado; e (4) dano máximo. Deverá ser também realizada medição da “cauda” desses “cometas” (variável quantitativa), utilizando-se o programa computacional KS-300® (Carl Zeiss, Alemanha), em um sistema de análise de imagens por computador acoplado a um microscópio Axiolab® (Carl Zeiss, Alemanha). A eletroforese deverá permitir avaliar os danos ao DNA, causados por processos biológicos como quebras de cadeia simples de DNA, lesões a sítios álcali-lábeis ou, ainda, reparo incompleto dos sítios de excisão. A variável qualitativa representará a proporção de extensão dos danos ao DNA nas quatro classes em análise, podendo ser confrontadas por uma análise de proporções multinomiais.

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

#### **3.10.10. Danos morfológicos**

Efeitos histopatológicos deverão ser avaliados nas amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima, devendo ser coletadas, ainda, amostras de gônadas para estudo de ecotoxicologia reprodutiva e histopatologias gonadais análise quantitativa de atresia folicular e outras patologias gonadais. No momento da coleta, as amostras de tecidos deverão ser pesadas e, com base no peso corporal e dos órgãos coletados, deverá ser obtido o peso relativo (PR) de cada um deles  $PR = MP/MC \times 100$ ; onde: MC = massa corporal; MP = massa total do órgão. Fragmentos de fígado e brânquias deverão ser imersos em paraformaldeído 4% por 24 h, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. O material deverá ser seccionado em micrótomo rotativo. As secções obtidas deverão ser coradas com hematoxilina/eosina e tricômio de Mallory. Algumas lâminas deverão ser submetidas à técnica de coloração PAS, devendo para isso ser banhadas em

ácido periódico 1% por 10 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff por 20 min. Em seguida, deverá ser realizada uma nova lavagem em água corrente por 10 min, seguida de coloração com hematoxilina de Harris por 3 min, lavagens em água destilada, desidratação e montagem. Este material deverá ser utilizado para análises histopatológicas, onde deverão ser avaliados: áreas de necrose, esteatose, gotículas lipídicas, colestase, neoplasias, melanomacrófagos, alterações nucleares, congestão hemorrágica, infiltrados inflamatórios, fibrose e aneurisma lamelar.

#### **3.10.11 biomarcadores de desregulação endócrina**

Também deverão ser realizadas análises de biomarcadores de desregulação endócrina: vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrp) em amostras de fígado e/ou plasma sanguíneo, especialmente em machos e a determinação da razão sexual e a proporção de peixes intersexo nas amostras.

## **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANVISA, 2013. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC nº 42, de 29 de Agosto de 2013.

APHA, 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington.

Bleuter E. 1975. Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton.

Childress JJ, Somero GN. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. Marine Biology 52: 273-283.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília, Brasil.

Covaci A, Koppen G. 2002. Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50–65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 2: correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. Chemosphere 48: 827-832.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta 329: 23-38.

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

EPA, 2014. Method 8270D Semivolatile Organic Compounds By Gas

[1] Comentário:



Chromatography/Mass Spectrometry. SW-846 Update V, 8270D-71, Revision 5 July 2014. United States Environmental Protection Agency, USA.

Faria FA, Silva-Costa A, Gianuca DM, Bugoni L. 2016. Cocol heron (*Ardea cocoi*) connects estuarine, coastal, limnetic and terrestrial environments: an assessment based on conventional dietary and stable isotope analysis. *Estuaries and Coasts* 39:1271-1281.

Geraci JR, Lounsbury VL. 2005. Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings. Second Edition. National Aquarium in Baltimore, USA.

Henry RP, 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: Dodgson SJ, Tashian RE, Gros G, Carters ND (Eds.), The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. Plenum, New York, pp. 119-125.

McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244: 6049-6055.

Nadella SR, Fitzpatrick JL, Franklin N, Bucking C, Smith S, Wood CM. 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 149: 340-348.

Oakes KD, van Der Kraak GJ. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63: 447-463.

Péqueux A, Chapelle S. 1982. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and phospholipids in two euryhaline crabs related to changes in the environmental salinity. *Marine Biology Letters* 3: 43-52.

REMANE. 2005. Protocolo de Conduta para Encalhes de Mamíferos Aquáticos da Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste. Rede de Encalhe de Mamíferos Aquáticos no Nordeste, IBAMA, Recife, 298 p.

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

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

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

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

Vajreswari A, Srinivasa Rao P, Kaplay SS, Tulpule PG. 1983. Erythrocyte membrane in

rats fed high euricic acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, and (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)- and (Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-ATPases. *Biochemica Medica* 29: 74-84.

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

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