

Material Suplementar A1MS1

Anexo 1 – Ambiente Marinho

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

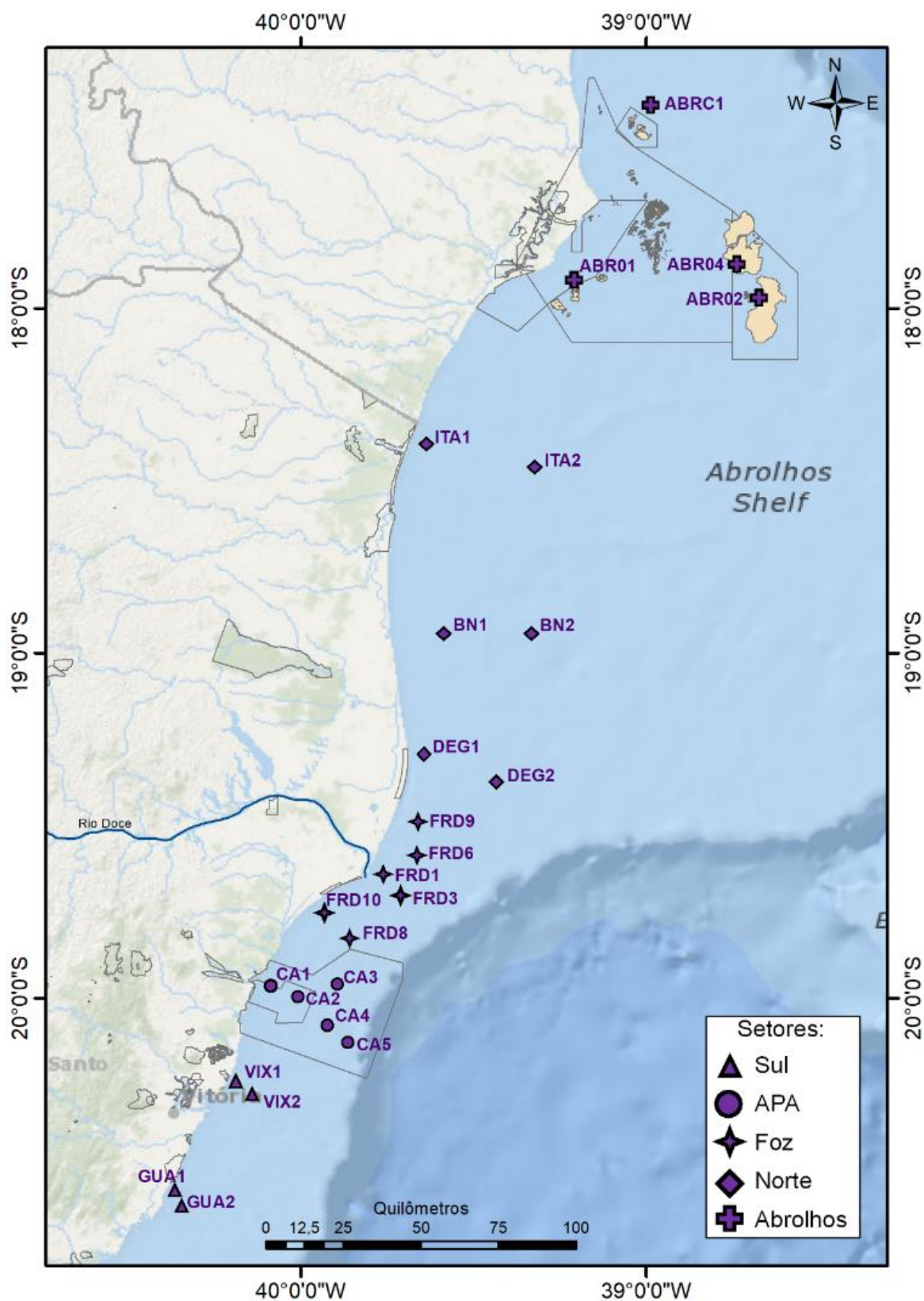
1.1 MALHA AMOSTRAL

Como estabelecido no Plano de Trabalho do Anexo 1, o monitoramento ecotoxicológico foi realizado sazonalmente (períodos secos e chuvosos) durante o Ano 1 (out/2018 a set/2019) e Período de Transição (out/2019 a mar/2020), em 4 campanhas, distribuídas da seguinte forma: campanha 1 (set/out 2018), campanha 2 (jan/fev 2019), campanha 3 (set/out 2019) e campanha 4 (jan/fev 2020). Conforme definido no TR4 e, posteriormente, na Nota Técnica nº3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, o monitoramento marinho contemplou 25 estações amostrais, desde regiões próximas a Guarapari/ES até o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, em Caravelas/BA. O nome e código de cada estação amostral e sua posição geográfica estão apresentados na Figura 1 e no Quadro 1. Amostras de água, sedimento e biota coletadas nos pontos de amostragem foram realizadas conforme autorização para atividades com finalidade científica emitida em 30/08/2018 pelo ICMBio/MMA (no 64261-1). As atividades que envolvem captura, coleta e/ou manipulação de vertebrados possuem autorização da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da FURG (Certificados no. Pq015/2018 e no. Pq020/2018). As amostras coletadas foram processadas e/ou têm testemunhos devidamente armazenadas nos laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande - FURG (Rio Grande, RS), Universidade Federal do Espírito Santo - UFES (São Mateus, ES) e Universidade Federal Fluminense – UFF (Rio de Janeiro, RJ).

Quadro 1 - Estações amostrais marinhas do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM e respectivas posições geográfica (latitude e longitude) em UTM Sirgas 2000. APA: Área de Proteção Ambiental; Revis: Refúgio de Vida Silvestre; Resex: Reserva Extrativista; ARIE: Área de Relevante Interesse Ecológico.

NOME DA ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO DA ESTAÇÃO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIRGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Guarapari 1	GUA1	APA de Setiba	7723667,77	355156,85
Guarapari 2	GUA2	APA de Setiba	7719405,95	357393,32
Vitoria 1	VIX1	-	7759040,18	373370,92
Vitoria 2	VIX2	-	7755589,67	378037,01
Costa das Algas 1	CA1	Revis Santa Cruz	7790616,41	384042,73
Costa das Algas 2	CA2	Revis Santa Cruz	7787276,74	391745,12
Costa das Algas 3	CA3	APA Costa das Algas	7791153,28	404234,57
Costa das Algas 4	CA4	APA Costa das Algas	7787200,53	401010,39
Costa das Algas 5	CA5	APA Costa das Algas	7771576,57	411733,92
Foz do Rio Doce 1	FRD1	-	7826708,46	417558,23
Foz do Rio Doce 3	FRD3	-	7819938,12	422768,53
Foz do Rio Doce 6	FRD6	-	7832036,66	427720,85
Foz do Rio Doce 8	FRD8	-	7805922,41	407208,69
Foz do Rio Doce 9	FRD9	-	7842923,74	428268,74
Foz do Rio Doce 10	FRD10	-	7814269,72	399458,35
Barra Nova 1	BN1	-	7903774,11	435969,74
Barra Nova 2	BN2	-	7903846,12	462242,81
Degredo 1	DEG1	ARIE do Degredo	7864891,21	429405,3
Degredo 2	DEG2	-	7856730,3	451968,3
Itaúnas 1	ITA1	Parque Estadual de Itaúnas	7964547,9	430449,2
Itaúnas 2	ITA2	-	7956840,44	463552,34
Abrolhos 1	ABR01	Resex de Cassurubá	8017006,73	475936,13
Abrolhos 2	ABR02	Parque Nacional Marinho de Abrolhos	8010704,39	532065,56
Abrolhos 4	ABR04	APA Ponta da Baleia/Abrolhos	8022616,67	525452,4
Abrolhos Controle 1	ABRC1	-	8072874,16	498657,66

Figura 1 - Mapa da malha amostral marinha monitorada pelo Anexo 1 do PMBA – Fest/RRDM. A nomenclatura das estações amostrais e as respectivas coordenadas geográficas encontram-se descritas no Quadro 1.



1.2 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

As coletas de água foram realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal do tipo *Van Dorn*. Em todas as estações amostrais foram coletadas 6 amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL de cada amostra) para a análise das concentrações de metais totais e 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL de cada amostra) de água filtrada (filtro de 0,45 µm de malha) para a análise das concentrações de metais na fração dissolvida. Imediatamente após a coleta, alíquotas das amostras para a determinação das concentrações totais e dissolvidas de metais foram acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas. Nas amostras de água foram analisados os seguintes elementos: Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al), sendo que estes dois últimos passaram a ser analisados a partir do Período de Transição (campanha 3 - set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020). Por apresentar características químicas intermediárias entre metais e não metais, o Arsênio é classicamente classificado como um elemento do grupo dos metaloides. Entretanto, este elemento apresenta um comportamento toxicológico muito semelhante aos elementos metálicos. Por esta razão, para fins do presente relatório, o elemento Arsênio foi considerado dentro do grupo dos metais para as análises integradas. Adicionalmente, amostras de água foram coletadas para frascos de diferentes volumes e, imediatamente, congeladas (-20° C) para uso nos testes de toxicidade.

No momento da coleta das amostras de água na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, foram realizadas as medidas da temperatura, condutividade elétrica, salinidade, pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetros (*YSI Professional Plus*).

1.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO

Em todas as estações amostrais utilizadas para a coleta de água foram coletadas, também, amostras de sedimento 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) da amostra de sedimento, obtendo-se, assim, apenas o sedimento superficial. Foram coletados, aproximadamente, 50 g de sedimento, e as amostras foram armazenados em frascos plásticos descontaminados e mantidas congeladas até o momento das análises. Em todas as amostras de sedimento foram analisados os seguintes elementos: Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al), sendo que estes dois últimos passaram a ser analisados a partir do Período de Transição (campanha 3 - set/out 2019 e campanha 4 - jan/fev 2020). Adicionalmente, amostras de sedimento foram coletadas para frascos de diferentes volumes e, imediatamente, refrigeradas (<10° C) para uso nos testes de toxicidade.

1.4 COLETA DE AMOSTRAS DE BIOTA

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

No caso dos pontos amostrais localizados na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, sempre que possível, coletou-se os seguintes organismos: fitoplâncton (coleta com rede de fitoplâncton); zooplâncton (coleta com redes de zooplâncton); macrocrustáceos (coleta com rede de arrasto ou armadilha); peixes (coleta com redes de arrasto, emalhe 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, previstas no TR4, em todos os pontos amostrais e/ou em número amostral mínimo, necessário para as análises de bioacumulação e respostas de biomarcadores, substituiu-se as mesmas por outras que já foram 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. Para o Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019 e campanha 4 – jan/fev 2020), as listas completas de espécies, incluindo o nome científico, nome popular e número de indivíduos coletados em cada estação amostral são apresentados como resultados nos Quadros 1 e 2 do Material Suplementar A1MS2. Para a região de Abrolhos, especificamente, foram coletados corais da espécie *Mussismilia harttii* e hidrocorais da espécie *Mussismilia harttii*, de forma manual por mergulho, seguindo procedimento realizado nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (jan/2016 - fev/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Exemplares de poliquetas e moluscos não foram coletados em todas as campanhas do Anexo 1 devido a dificuldades metodológicas durante a coleta, considerando que os invertebrados bentônicos de fundo inconsolidado dessas localidades são pequenos e sua triagem requer uso de lupa e uma triagem minuciosa do sedimento. As condições da embarcação, logística relacionada ao volume do sedimento a ser triado, biomassa mínima de cada grupo (poliqueta, moluscos, etc) necessária para análise de metais e biomarcadores, além do fato de que essa triagem deveria 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, inviabilizam a coleta de invertebrados bentônicos concomitante com as demais atividades diárias previstas, e nas condições atuais de logística. Cabe mencionar que estes organismos já não haviam sido encontrados com biomassa e condições adequadas para análise de biomarcadores nas expedições anteriores ao PMBA – Fest/RRDM.

A coleta para as análises de metais nas amostras dos 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 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 já 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, adotou-se 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 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, coletou-se a hemolinfa de cada indivíduo e dissecou-se os organismos 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.

Todas as amostras biológicas 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 para o laboratório, onde mantiveram-se congeladas em freezer comum (-20 °C) até o momento das análises de metais. Nestas amostras, analisou-se os seguintes elementos: Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Zinco (Zn). Assim, como para as amostras de água e sedimento, a partir do Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019) os metais Níquel (Ni) e Alumínio (Al) também passaram a ser determinados nas amostras de biota. Da mesma forma, as amostras dos organismos coletados para as análises de biomarcadores foram acondicionadas em tubos criogênicos e congeladas em nitrogênio líquido (em campo) e após serem transportadas para o laboratório foram mantidas à -80°C para posterior análise de biomarcadores de exposição e de efeito. Realizou-se as análises dos biomarcadores em tecidos específicos dos organismos, considerando-se a natureza de cada biomarcador, conforme detalhado mais adiante.

1.5 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA NA ÁGUA, SEDIMENTO E CORAIS

O monitoramento da comunidade microbiana total em amostras de água, sedimento e associada aos corais foi coletada utilizando-se triplicatas 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, amostras de corais dos quatro pontos de monitoramento na região de Abrolhos, incluindo um recife-controle (ABRC1 – ver Figura 1 deste documento), fora de possíveis rotas de dispersão dos sedimentos também foram coletadas. A análise da microbiota total em amostras de água, sedimento e associada aos corais, deu-se através da extração do DNA total, utilizando o PowerSoil

DNA isolation kit (MoBio, USA), e posterior sequenciamento de DNA, utilizando-se sequenciadores de nova geração. As leituras foram geradas e processadas, utilizando o programa Mothur v.1.33. A análise das sequências obtidas permitiu a avaliação do core microbiano e os microrganismos presentes nas diferentes amostras, nos diferentes pontos e nas diferentes campanhas, correlacionando estatisticamente os resultados de diversidade microbiana obtidos com as demais análises realizadas no programa de monitoramento. Essa avaliação é importante não apenas para indicar possíveis alterações ambientais temporais e/ou pontuais, como ainda para apontar bioindicadores microbianos específicos da presença de metais nas diferentes áreas amostradas, que podem ser rastreados em áreas adjacentes.

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

A análise das concentrações dos elementos Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg), Zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al) nas amostras de água, sedimento, invertebrados (indivíduos inteiros ou tecidos) e peixes (tecidos) foram realizadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Por sua vez, realizou-se a análise da concentração de Hg nestas amostras pelo método de vapor frio, utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica (AAS) ou de fluorescência atômica (AFS; Mercur; Analytik-Jena). Para as análises de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Zn, Ni e Al as amostras de água filtradas e não filtradas oriundas dos pontos amostrais da foz do Rio Doce e região costeira adjacente foram dessalinizadas, a fim de minimizar um possível "efeito matriz" associado às altas concentrações de íons presentes na água salgada (Nadella et al., 2009). As concentrações totais e dissolvidas dos metais nas amostras de água foram expressas em µg/L. Para verificar a acurácia e exatidão das análises, foram realizados controles de qualidade analíticos. Para tanto, analisamos "brancos", onde todos os procedimentos de preparo e análise das amostras foram igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, utilizou-se as soluções-padrão certificadas pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC) para os metais analisados nos diferentes tipos de águas (NASS-6: água marinha; SLEW-3: água salobra; SLRS-6: água doce).

Com relação ao sedimento, as análises de metais e As realizadas nas campanhas 1 (set/out 2018) e 2 (jan/fev 2019) foram baseadas no método de Lana et al. (2006), com modificações. O método consiste em pesar em um frasco de plástico, uma alíquota de 1g do sedimento coletado e lavá-lo, para eliminar interferentes salinos, com água ultrapura. Após, o sedimento foi seco em estufa à 60° C até obtenção de peso seco constante e, então, submetido ao processo de digestão. Para tal, na amostra seca, foram adicionados 10 mL de uma mistura de ácido nítrico: ácido clorídrico (1:1), o frasco agitado levemente em vórtex e mantido tampado em estufa a 60°C por 24 h e/ou até que não houvesse liberação de vapores amarelados e o resíduo sólido ficasse translúcido. A solução resultante foi centrifugada a 3.000 g por 10 min, sendo que o precipitado foi descartado. Uma alíquota do extrato foi diluída e transferida para o vial do amostrador automático do FG-EAA para a determinação das concentrações de Al, As,

Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Mn e Zn. Outra alíquota do extrato foi diluída para a determinação de Hg. Para tanto, em um volume de 5 mL de extrato diluído da amostra foram adicionadas 3 gotas da solução de permanganato de potássio 5%. A mistura foi então transferida para o vial do amostrador automático do EFA-GVF para a determinação da concentração de Hg. Nas campanhas 3 (set/out 2019) e 4 (jan/fev 2020), as amostras de sedimento foram congeladas e liofilizadas. Em seguida, foi submetida ao processo de extração conforme EPA 3051A que, resumidamente, consistiu na pesagem de 0,25g de sedimento macerado (gral e pistilo de ágata), adição de 10 ml de HNO₃ Suprapur Merck e aquecimento em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras foram centrifugadas, o material precipitado foi descartado e o extrato foi diluído. Uma alíquota do extrato foi transferida para o vial do amostrador automático do FG-EAA para a determinação das concentrações de Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Mn e Zn e outra alíquota foi separada para a determinação de Hg com adição de 3 gotas da solução de permanganato de potássio 5% na amostra. A mistura foi, então, transferida para o vial do amostrador automático do EFA-GVF para a determinação da concentração de Hg. De fato, o que alterou entre as metodologias aplicadas no Ano 1 e no Período de Transição foi o procedimento de preparo da amostra.

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

1.7 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 a serem analisados. As metodologias empregadas para as análises dos biomarcadores em organismos coletados no ambiente marinho estão listadas no Quadro 2 e, encontram-se descritas abaixo. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises e de precisão e reprodutibilidade dos dados, sempre que possível, foram utilizados kits comerciais de reagentes específicos que utilizam metodologia semelhante àquelas descritas abaixo, para a determinação dos respectivos biomarcadores.

Quadro 2 - Lista dos biomarcadores analisados em amostras de organismos coletados pelo Anexo 1 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)
Poliquetos, anfípodos, isópodos e moluscos	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (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)

1.7.1 Concentração de metalotioneínas (MT)

A determinação da concentração de metalotioneínas foi realizada por meio de um kit comercial de reagentes (Fish Metallothionein ELISA Kit, fornecido pela MyBiosource), cujo princípio de análise utiliza

um método espectrofotométrico em microplaca. Os procedimentos analíticos para determinação da concentração de MT seguiram aqueles descritos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g MT/mg proteína}$.

1.7.2 Atividade de enzimas envolvidas na calcificação

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 efetivada, baseando-se no 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 ditritotritol (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.

1.7.3 Composição iônica corporal, hemolinfática ou plasmática

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 espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. Por sua vez, a concentração de cloretos foi analisada, com auxílio de um kit comercial, pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Os resultados foram expressos em mg/g de peso úmido. No que se refere à composição iônica hemolinfática e plasmática, os resultados foram expressos em mg/L.

1.7.4 Atividade das enzimas do metabolismo energético

As atividades da lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) foram analisadas em homogeneizados das amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento dulcícola e marinho. 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 da LDH foi realizada através do kit comercial Desidrogenase Láctica LDH UV® fornecida pelo Bioclin®. Para a determinação da atividade da MDH foram adicionados a alíquotas de sobrenadante 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 em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados foi determinada pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades enzimáticas/mg de proteína.

1.7.5 Atividade de enzimas antioxidantes

Analisou-se as atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no item acima. A atividade da CAT foi determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conforme descrito por Aebi (1984). Por sua vez, a atividade da SOD foi medida através da taxa de inibição da auto-oxidação do pirogalol, de acordo com o protocolo de Marklund e Marklund (1974). A dosagem de proteínas totais nos homogeneizados foi determinada pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades enzimáticas/mg de proteína.

1.7.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada nas amostras biológicas utilizando-se um método espectrofotométrico em microplaca, seguindo as recomendações do kit comercial TBARS Assay Kit, fornecido pela Chayman Chemical. Este método quantifica os danos em lipídios por meio da reação do

malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação ocorre em condições de acidez e alta temperatura (95°C), gerando um cromógeno fluorescente. A fluorescência gerada foi medida utilizando-se um espectrofluorímetro (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm). Calculamos os dados com base em uma curva construída com soluções-padrão de MDA sendo os resultados normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, o qual foi determinado utilizando-se o método de Bradford e expressos em nmol MDA/mg proteína.

1.7.7 Oxidação de proteínas

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

1.7.8 Danos de DNA

O TR4 estipula a realização de, pelo menos, duas das cinco metodologias diferentes previstas para avaliação de danos à molécula de DNA (detecção de sítios AP através de kit comercial, ensaio do vermelho neutro, teste de micronúcleo, ensaio cometa, e detecção de caspases por imunohistoquímica). Considerando que todas estas metodologias estão associadas ao mesmo biomarcador de efeito (danos ao DNA) e, portanto, fornecem dados semelhantes, as amostras foram testadas através de duas técnicas sensíveis, 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 (DNA isolation kit, fornecido pela PromoKine, Promocell©). A análise propriamente dita de sítios AP foi realizada, utilizando-se uma sonda capaz de reagir com o grupo aldeído destes sítios, a qual foi detectada por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para tal, foi utilizado um kit de reagentes de detecção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (DNA Damage Detection Kit, fornecido pela Promokine, Promocell©; ou outro kit similar). Os resultados foram expressos em sítios AP/10⁵ pares de bases (bp).

Para a avaliação do dano no material genético através do ensaio de micronúcleo (MN), foram utilizadas amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante as campanhas, conforme descrito acima. Tais amostras foram coletadas com seringas (1 mL), munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos às células e transferidas para tubos e centrifugados em microcentrífuga (1.000 rpm, por 5 min), com retirada de 50 µL com micropipeta, colocada junto ao fundo do tubo. Este volume de material foi gotejado na lateral da lâmina, sendo espalhado por esfregaço com auxílio de outra lâmina. O procedimento foi realizado individualmente, com a obtenção de três lâminas/indivíduo, as

quais foram secas ao ar e fixadas com solução metanol por cerca de 20 min, com nova secagem a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 2%, preparada em tampão fosfato pH 8,0 (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4), também por 20 min. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas com água deionizada, secas ao ar e montadas com lamínulas e Entellan® (Merck®). Posteriormente, examinou-se as lâminas sob microscópio óptico comum e as células micronucleadas foram contadas. As três lâminas de cada indivíduo foram avaliadas em aumento de 1000 x, com avaliação de 1000 células em cada lâmina, sendo, então, quantificado o número de células micronucleadas por 1000 células analisadas (frequência em %). Cabe ressaltar que, devido às dificuldades metodológicas enfrentadas no campo, durante o processamento das lâminas de hemolinfa, as mesmas não puderam ser devidamente analisadas, visto o reduzido número de hemócitos e a baixa integridade estrutural destas células, o que inviabilizou a apresentação do resultado de MN para as espécies de crustáceos coletadas pelo Anexo 1 nos distintos ambientes monitorados.

1.7.9 Danos morfológicos

Efeitos histopatológicos foram avaliados nas amostras de brânquias e fígado de peixes. Fragmentos de fígado e brânquias foram imersos em solução de Bouin por 8 h, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplaxt. O material foi seccionado em micrótomo rotativo. As secções obtidas foram coradas com hematoxilina/eosina e tricômio de Mallory. Algumas lâminas foram submetidas à técnica de coloração PAS, para isso, foram banhadas em ácido periódico 1% por 10 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff, por 20 min. Em seguida, efetivou-se uma nova lavagem em água corrente por 10 min, seguida de coloração com hematoxilina de Harris, por 3 min, lavagens em água destilada, desidratação e montagem. As alterações nos fígados e brânquias foram determinadas de acordo com o método proposto por Bernet e colaboradores (1999). Esse método baseia-se na relevância patológica e na extensão das lesões observadas nos órgãos analisados. As alterações foram classificadas em cinco padrões de reação, onde cada lesão possui um grau de importância. O Índice do Órgão (Iorg) representa o grau de dano apresentado pelo órgão e foi calculado pela fórmula: $I_{org} = \sum r_p \sum a_l t (a \times w)$, onde: r_p = padrão de reação, a_l = 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 ($I_{rp} = \sum a_l t (a \times w)$, onde r_p = padrão de reação, a_l = alteração, a = extensão da lesão e w = grau de importância).

1.7.10 Biomarcadores de desregulação endócrina

Também foram realizadas análises de biomarcadores de desregulação endócrina, vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrp), em amostras de plasma sanguíneo dos peixes coletados durante o monitoramento. Para tanto, foi utilizado um kit comercial de reagentes (Semi-Quantitative Biomarker ELISA Component Kit For Fish Samples, Cayman Chemical, Ann Harbour, MI, EUA), cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

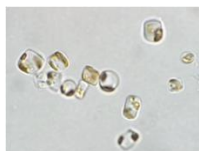



1.8 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Ensaio ecotoxicológico foram realizados para classificar amostras de água e sedimento, coletadas na região marinha adjacente ao Rio Doce, quanto a sua toxicidade, cumprindo com o disposto no TR4. Os pontos de amostragem estão dispostos no Quadro 3. Cabe ressaltar que um ponto em Degrado (DEG1) foi incluído no monitoramento a partir do Período de Transição. As amostras de água, elutriato de sedimento e sedimento total foram coletadas, armazenadas e preparadas, segundo a norma da ABNT NBR 15469, para a realização dos testes de toxicidade descritos na Tabela 1. Para o cálculo do índice de toxicidade, levou-se em consideração a severidade da resposta observada (Quadro 4) e sensibilidade do organismo testado (Quadro 5). As respostas subletais foram classificadas como menos severas e a letalidade como mais severa; enquanto os organismos mais sensíveis foram valorizados, recebendo maior número na escala de sensibilidade. A valorização das espécies mais sensíveis é importante para que o impacto não seja subestimado. Os valores de toxicidade foram usados para classificar as amostras desde não-tóxicas a altamente tóxicas (Tabela 2). Vale lembrar que, para cada ponto amostral, esta classificação foi feita separadamente para água e sedimento, e levou em consideração a média dos valores de toxicidade resultantes dos diferentes ensaios realizados com as matrizes ambientais. O mesmo procedimento de classificação foi usado para o Ano 1 e Período de Transição para os ambientes dulcícola e marinho.

Quadro 3 :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 Período de Transição (campanha 3 – set/out 2019 e campanha 4 – jan/fev 2020). O ponto CA2 não foi amostrado na campanha 3 (set/out 2019).

AMBIENTE	ANO 1	PERÍODO DE TRANSIÇÃO	ALTERAÇÃO DE MALHA AMOSTRAL
Marinho	FRD1 FRD6 CA1 CA2	FRD1 FRD6 CA1 CA2 DEG1	Inclusão da estação DEG1

Tabela 1: Resumo dos ensaios de toxicidade realizados com amostras coletadas na malha amostral marinha do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

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	Laboratório de Ecotoxicologia da Base Oceanográfica/UFES	Ambiente Natural – Coqueiral/ES	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 4: Índice de severidade atribuído de acordo com severidade da resposta observada nos ensaios de toxicidade.
O parâmetro mais tóxico é classificado com maior valor.

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

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

Organismo-teste	Índice de Sensibilidade
Plâncton (microalgas, microcrustáceos, ovos e larvas de ouriços e larvas de peixes)	3
Peixe juvenil	2
Peixe adulto	1

Tabela 2: 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.

1.9 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 Janeiro, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 16181: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – microalgas marinhas. Rio de Janeiro, 2013.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. 1999. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution**. Journal of fish diseases, 22: 25-34.
- BULICH, A.A. 1982. **A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples**. Process Biochemistry, 17(2): 45-47.
- CHILDRESS, J. J., SOMERO, G.N. 1979. **Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts**. Marine Biology, 52(3): 273-283.
- 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. 1974. **Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase**. European journal of biochemistry, 47(3): 469-474.
- NADELLA, S.R., FITZPATRICK, J.L., FRANKLIN, N., BUCKING, C., SMITH, S., WOOD, C.M. 2009. **Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon**. Comparative Biochemistry and Physiology C 149: 340-348.

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

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

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

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