

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

**ACES2 – Material Suplementar 2**

**Ambiente Costeiro – Tema Ecotoxicologia - Metodologia**

**RT-42 / JAN 23**

**RSE2022 PMBA/FEST**

Vitória,

Janeiro de 2023

# 1 ECOTOXICOLOGIA– METODOLOGIA GERAL DO AMBIENTE COSTEIRO - RELATÓRIO SEMESTRAL 2022 (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 os três anos de monitoramento, totalizando 6 campanhas, distribuídas da seguinte forma: campanha 1 (set/out 2018 – período seco), campanha 2 (jan/fev 2019 – período chuvoso), campanha 3 (set/out 2019 – período seco), campanha 4 (jan/fev 2020 – período chuvoso), campanha 5 (jan/fev 2021 – período chuvoso), campanha 6 (jul/ago 2021 – período seco) e campanha 7 (mar/ 2022 – período chuvoso). Devido à pandemia da COVID-19, a amostragem prevista para o período seco de 2020 não foi realizada.

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

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

ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Aracruz 1 - Refúgio	ARR	REVIS Santa Cruz	7787892,37	379908,15
Aracruz 2 - Putiri	ARP	REVIS Santa Cruz	7795558,41	382269,99
Doce Sul 1 - Barra do Riacho	DSB	Reserva Indígena de Comboios	7807767,56	389346,33
Doce Sul 2 - Comboios	DSC	Reserva Indígena de Comboios	7818546,19	398483,36
Doce Sul 3 - Regência	DSR	Reserva Biológica de Comboios	7824460,93	407416,09
Doce Norte 1 - Povoação	DNP	-	7834350,26	417863,32
Doce Norte 2 – Vila de Cacimbas	DNC	ARIE do Degredo	7857980,26	426646,32
Doce Norte 3 - Pontal do Ipiranga	DNPI	-	7877396,26	425784,32
Doce Norte 4 - Urussuquara	DNU	-	7897769,26	423026,32
Doce Norte 5 - Guriri	DNG	-	7929528,26	421308,32

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

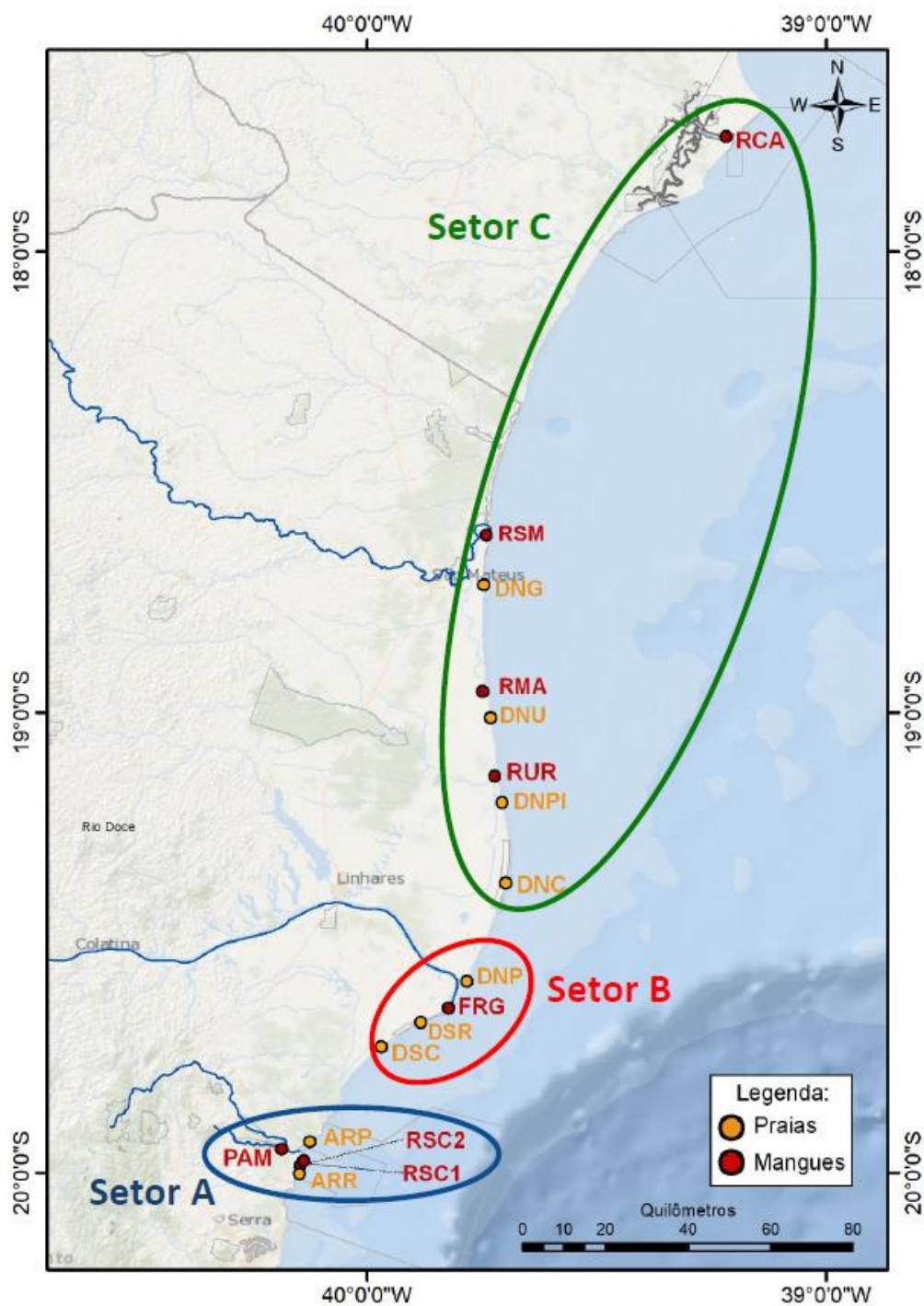
Quadro 2 - Estações amostrais referentes ao monitoramento de manguezais. Coordenadas geográficas apresentadas em UTM Sirgas 2000. APA: Área de Proteção Ambiental; REVIS: Refúgio de Vida Silvestre; RDS: Reserva de Desenvolvimento Sustentável.

ESTAÇÃO AMOSTRAL	CÓDIGO	UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	COORDENADAS UTM (datum SIGAS 2000)	
			LATITUDE	LONGITUDE
Rio Piraquê-Açú	PAM	RDS Municipal Piraquê-Açú e Piraquê-Mirim	7793773,70	375807,78
RVS Santa Cruz 1	RSC1	REVIS Santa Cruz	7789712,90	380046,67
RVS Santa Cruz 2	RSC2	REVIS Santa Cruz	7791054,80	380874,96
Foz de Regência	FRG	-	7827888,28	413724,67
Rio Urussuquara	RUR	-	7883642,67	423977,15
Rio Mariricu	RMA	-	7904064,17	421175,81
Rio São Mateus	RSM	APA Conceição da Barra	7941617,31	421850,06
Rio Caravelas	RCA	APA Ponta da Baleia/Abrolhos	8037466,47	476880,37

A coleta de amostras de aves foi realizada conforme os hábitos alimentares das mesmas, nos ambientes de estuário, mangues e costeiro, em três áreas amostrais: estuário do Rio Doce - Linhares (ES), manguezal na foz do Rio Piraquê-açú - Aracruz (ES), e costa adjacente à foz do Rio Doce Norte e Sul.

Todas as atividades de campo foram realizadas conforme autorização para atividades com finalidade científica emitida em 30/08/2018 pelo ICMBio/MMA (no 64261-6). As atividades que envolvem captura, coleta e manipulação de vertebrados possuem autorização da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da FURG (Processo 23116.007254/2018-94).

Figura 1 - Estações amostrais referentes ao monitoramento do ambiente costeiro e respectivos agrupamentos em setores. Ver Quadros 1 e 2.



### 1.3 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

As coletas de amostras de água de fundo e de superfície destinadas às análises químicas seguiram a metodologia padrão empregada desde a Campanha 1 (set/out 2018). Todavia, as determinações dos elementos Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg) e Zinco (Zn). Níquel (Ni) e Alumínio (Al) nas amostras referentes a Campanha 7 (março 2022 – período chuvoso) ficaram sobre responsabilidade dos laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova.

Resumidamente, as coletas de água, ao longo da coluna d'água, foram realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal do tipo *Van Dorn*. Em todas as estações amostrais foram coletadas 6 amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 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® (HNO<sub>3</sub>, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas. Adicionalmente, amostras de água foram coletadas para frascos de diferentes volumes e, imediatamente, congeladas para uso nos testes de toxicidade.

### 1.4 ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

No momento da coleta das amostras de água, foram realizadas as medidas da temperatura, condutividade elétrica, salinidade, pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetro (YSI Professional Plus). A concentração de carbono orgânico, sulfatos, alcalinidade total e composição iônica (concentrações de Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>) ficaram sobre responsabilidade dos laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova.

### 1.5 COLETA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO

As coletas de amostras de sedimento destinadas às análises químicas seguiram a metodologia padrão empregada desde a Campanha 1 (set/out 2018). Todavia, as determinações dos elementos Arsênio (As), Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Mercúrio (Hg) e Zinco (Zn). Níquel (Ni) e Alumínio (Al) das amostras referentes a Campanha 7 (março 2022) ficaram sobre responsabilidade dos laboratórios acreditados, por determinação da Fundação Renova.

Em todas as estações amostrais utilizadas para a coleta de água foram coletadas também amostras de sedimento superficial com auxílio de draga do tipo *Van Veen*. Em cada local de amostragem foram coletadas 4 amostras de sedimento. As amostras foram abertas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento e fotografadas imediatamente após a coleta, a

fim de registrar as características visuais do sedimento. Para a análise de metais, as amostras foram coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0 - 5 cm) e obtendo-se apenas o sedimento superficial. Para cada amostra, foram coletados aproximadamente 50 g de sedimento, os quais foram armazenados em frascos plásticos descontaminados e mantidos congelados até o momento das análises.

## 1.6 COLETA DE AMOSTRAS DE BIOTA - INVERTEBRADOS

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

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

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

Todas as amostras biológicas coletadas foram acondicionadas em tubos criogênicos e congeladas em nitrogênio líquido em campo, sendo posteriormente transferidas para um ultrafreezer (-80°C), onde permaneceram acondicionadas até a análise. Nestas amostras, analisaram-se os seguintes elementos: arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), zinco (Zn), Níquel (Ni) e Alumínio (Al). As amostras biológicas também foram analisadas em



termos dos biomarcadores em tecidos específicos dos organismos, considerando-se a natureza de cada biomarcador, conforme será detalhado mais adiante.

## 1.7 COLETA DE AMOSTRAS DE BIOTA - AVES

As atividades de campo para coleta das amostras de aves foram realizadas pela TEIA – Projetos Ambientais Ltda, em regiões estuarinas, de manguezais e costeiras, nos municípios de Aracruz, Linhares e São Mateus, no estado do Espírito Santo.

Realizaram-se as capturas e coletas das aves nos locais amostrados, conforme Autorização para atividades com finalidade científica, emitida pelo ICMBio/MMA. A presente autorização contempla a coleta de no máximo 20 aves em cada uma das 3 grandes regiões amostradas. Para as amostras de penas e sangue, poderia ser coletado, independentemente do método de coleta, um máximo de 60 espécimes por ano, considerando todas as localidades e estações do ano. Assim que a meta das amostras coletadas era atingida, a amostragem era interrompida.

A coleta das amostras foi realizada conforme os hábitos alimentares das aves relacionadas aos ambientes de estuário, manguezais e litoral, em três áreas amostrais: estuário do Rio Doce – Linhares (ES); manguezal na foz do Rio Piraquê-açu – Aracruz (ES); e praias da costa adjacente à foz do Rio Doce Norte e Sul. A representatividade das amostras seguiu os exemplos e prioridades estabelecidas no Plano de Trabalho do Anexo 1 - Ecotoxicologia. Porém, quando não se observou a ocorrência de representante de uma determinada guilda, esta foi substituída por outras guildas, desde que seus representantes possuíssem hábitos alimentares relacionados a ambientes dulcícola e estuarino, dentro da área de estudo (estuário, manguezais e praias). Com isso, optou-se por substituir espécies de aves que contemplavam algumas guildas tróficas (i.e. filtradores e malacófagos) e que, de fato, não ocorreram em certas áreas amostradas, por outras espécies com representatividade em seus hábitos alimentares, tais como: onívoros, consumidores de invertebrados, pequenos vertebrados e frutos [exemplos: Cuculidae (*Crotophaga major*), Tyrannidae (*Pitangus sulphuratus*); Mimidae (*Mimus gilvus*); Thraupidae (*Conirostrum bicolor*); e Icteridae (*Icterus jamacaii*)] e insetívoros, consumidores de insetos aquáticos e terrestres [exemplos: Dendrocolaptidae (*Dendroplex picus*); Tyrannidae (*Fluvicola nengeta*); Furnariidae (*Furnarius figulus* e *Certhiaxis cinnamomeus*); Hirundinidae (*Tachycinetta albiventer* e *Stelgidopteryx ruficollis*); e Caprimulgidae (*Nannochordeiles pusillus*)]. As espécies aqui citadas possuem associação com ambientes de mangue, restinga, corpos d'água e/ou podem estar presentes em ambientes dulcícola e estuarino (SICK, 1996; SIGRIST, 2006). A lista completa das espécies de aves coletadas durante a Campanha 7 (mar/ 2022) encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Lista de espécies de aves, cujas amostras de penas foram coletadas durante a Campanha 7 (período chuvoso, mar 2022) do Projeto Ecotoxicologia do PMBA/Fest.

Espécie	Ambiente	Tecido
<i>Actitis macularius</i>	Costeiro	Pena
<i>Arenaria interpres</i>	Costeiro	Pena
<i>Calidris alba</i>	Costeiro	Pena
<i>Chordeiles acutipennis</i>	Costeiro	Pena
<i>Columbina squammata</i>	Costeiro	Pena
<i>Columbina talpacoti</i>	Costeiro	Pena
<i>Conirostrum bicolor</i>	Costeiro	Pena
<i>Egretta caerulea</i>	Costeiro	Pena
<i>Egretta thula</i>	Costeiro	Pena
<i>Elaenia cf. mesoleuca</i>	Costeiro	Pena
<i>Elaenia flavogaster</i>	Costeiro	Pena
<i>Formicivora rufa</i>	Costeiro	Pena
<i>Machetornis rixosa</i>	Costeiro	Pena
<i>Mimus gilvus</i>	Costeiro	Pena
<i>Myiarchus ferox</i>	Costeiro	Pena
<i>Paroaria dominicana</i>	Costeiro	Pena
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Costeiro	Pena
<i>Pluvialis squatarola</i>	Costeiro	Pena
<i>Rallus longirostris</i>	Costeiro	Pena
<i>Rufirallus viridis</i>	Costeiro	Pena
<i>Stelgidopteryx ruficollis</i>	Costeiro	Pena
<i>Thalasseus acutiflavus</i>	Costeiro	Pena
<i>Thalasseus maximus</i>	Costeiro	Pena
<i>Todirostrum cinereum</i>	Costeiro	Pena
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Costeiro	Pena
<i>Amazonetta brasiliensis</i>	Estuário	Pena
<i>Anthus lutescens</i>	Estuário	Pena
<i>Butorides striata</i>	Estuário	Pena
<i>Campostoma obsoletum</i>	Estuário	Pena
<i>Certhiaxis cinnamomea</i>	Estuário	Pena
<i>Charadrius semipalmatus</i>	Estuário	Pena
<i>Chloroceryle amazona</i>	Estuário	Pena
<i>Chordeiles acutipennis</i>	Estuário	Pena
<i>Columbina squammata</i>	Estuário	Pena
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	Estuário	Pena
<i>Egretta thula</i>	Estuário	Pena
<i>Furnarius rufus</i>	Estuário	Pena
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	Estuário	Pena
<i>Glaucidium brasilianum</i>	Estuário	Pena



Espécie	Ambiente	Tecido
<i>Icterus jamacaii</i>	Estuário	Pena
<i>Megaceryle torquata</i>	Estuário	Pena
<i>Mustelirallus albicollis</i>	Estuário	Pena
<i>Myiozetetes similis</i>	Estuário	Pena
<i>Nannopterum brasilianus</i>	Estuário	Pena
<i>Paroaria dominicana</i>	Estuário	Pena
<i>Phaetusa simplex</i>	Estuário	Pena
<i>Picumnus cirratus</i>	Estuário	Pena
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Estuário	Pena
<i>Polytmus guainumbi</i>	Estuário	Pena
<i>Pteroglossus aracari</i>	Estuário	Pena
<i>Satrapa icterophrys</i>	Estuário	Pena
<i>Sicalis flaveola</i>	Estuário	Pena
<i>Sporophila collaris</i>	Estuário	Pena
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Estuário	Pena
<i>Vanellus cayanus</i>	Estuário	Pena
<i>Actitis macularius</i>	Mangue	Pena
<i>Celeus flavescens</i>	Mangue	Pena
<i>Charadrius semipalmatus</i>	Mangue	Pena
<i>Chloroceryle amazona</i>	Mangue	Pena
<i>Chloroceryle americana</i>	Mangue	Pena
<i>Columbina talpacoti</i>	Mangue	Pena
<i>Conirostrum bicolor</i>	Mangue	Pena
<i>Dendroplex picus</i>	Mangue	Pena
<i>Egretta caerulea</i>	Mangue	Pena
<i>Eupetomena macroura</i>	Mangue	Pena
<i>Fluvicola nengeta</i>	Mangue	Pena
<i>Furnarius rufus</i>	Mangue	Pena
<i>Icterus jamacaii</i>	Mangue	Pena
<i>Megaceryle torquata</i>	Mangue	Pena
<i>Mimus gilvus</i>	Mangue	Pena
<i>Nannopterum brasilianus</i>	Mangue	Pena
<i>Nyctanassa violacea</i>	Mangue	Pena
<i>Picumnus cirratus</i>	Mangue	Pena
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Mangue	Pena
<i>Tachycineta albiventer</i>	Mangue	Pena
<i>Troglodytes musculus</i>	Mangue	Pena
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Mangue	Pena
<i>Actitis macularius</i>	Costeiro	Sangue
<i>Arenaria interpres</i>	Costeiro	Sangue
<i>Calidris alba</i>	Costeiro	Sangue

Espécie	Ambiente	Tecido
<i>Chordeiles acutipennis</i>	Costeiro	Sangue
<i>Columbina squammata</i>	Costeiro	Sangue
<i>Columbina talpacoti</i>	Costeiro	Sangue
<i>Conirostrum bicolor</i>	Costeiro	Sangue
<i>Egretta caerulea</i>	Costeiro	Sangue
<i>Egretta thula</i>	Costeiro	Sangue
<i>Elaenia cf. mesoleuca</i>	Costeiro	Sangue
<i>Elaenia flavogaster</i>	Costeiro	Sangue
<i>Formicivora rufa</i>	Costeiro	Sangue
<i>Machetornis rixosa</i>	Costeiro	Sangue
<i>Mimus gilvus</i>	Costeiro	Sangue
<i>Myiarchus ferox</i>	Costeiro	Sangue
<i>Paroaria dominicana</i>	Costeiro	Sangue
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Costeiro	Sangue
<i>Pluvialis squatarola</i>	Costeiro	Sangue
<i>Rallus longirostris</i>	Costeiro	Sangue
<i>Rufirallus viridis</i>	Costeiro	Sangue
<i>Stelgidopteryx ruficollis</i>	Costeiro	Sangue
<i>Thalasseus acutiflavus</i>	Costeiro	Sangue
<i>Thalasseus maximus</i>	Costeiro	Sangue
<i>Todirostrum cinereum</i>	Costeiro	Sangue
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Costeiro	Sangue
<i>Amazonetta brasiliensis</i>	Estuário	Sangue
<i>Anthus lutescens</i>	Estuário	Sangue
<i>Butorides striata</i>	Estuário	Sangue
<i>Campostoma obsoletum</i>	Estuário	Sangue
<i>Certhiaxis cinnamomea</i>	Estuário	Sangue
<i>Charadrius semipalmatus</i>	Estuário	Sangue
<i>Chloroceryle amazona</i>	Estuário	Sangue
<i>Chordeiles acutipennis</i>	Estuário	Sangue
<i>Columbina squammata</i>	Estuário	Sangue
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	Estuário	Sangue
<i>Egretta thula</i>	Estuário	Sangue
<i>Furnarius rufus</i>	Estuário	Sangue
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	Estuário	Sangue
<i>Glaucidium brasilianum</i>	Estuário	Sangue
<i>Icterus jamacaii</i>	Estuário	Sangue
<i>Megasceryle torquata</i>	Estuário	Sangue
<i>Mustelirallus albicollis</i>	Estuário	Sangue
<i>Myiozetetes similis</i>	Estuário	Sangue
<i>Nannopterum brasilianus</i>	Estuário	Sangue

Espécie	Ambiente	Tecido
<i>Paroaria dominicana</i>	Estuário	Sangue
<i>Phaetusa simplex</i>	Estuário	Sangue
<i>Picumnus cirratus</i>	Estuário	Sangue
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Estuário	Sangue
<i>Pteroglossus aracari</i>	Estuário	Sangue
<i>Satrapa icterophrys</i>	Estuário	Sangue
<i>Sicalis flaveola</i>	Estuário	Sangue
<i>Sporophila collaris</i>	Estuário	Sangue
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Estuário	Sangue
<i>Vanellus cayanus</i>	Estuário	Sangue
<i>Actitis macularius</i>	Mangue	Sangue
<i>Celeus flavescens</i>	Mangue	Sangue
<i>Charadrius semipalmatus</i>	Mangue	Sangue
<i>Chloroceryle amazona</i>	Mangue	Sangue
<i>Chloroceryle americana</i>	Mangue	Sangue
<i>Columbina talpacoti</i>	Mangue	Sangue
<i>Conirostrum bicolor</i>	Mangue	Sangue
<i>Dendroplex picus</i>	Mangue	Sangue
<i>Egretta caerulea</i>	Mangue	Sangue
<i>Furnarius rufus</i>	Mangue	Sangue
<i>Icterus jamacaii</i>	Mangue	Sangue
<i>Megaceryle torquata</i>	Mangue	Sangue
<i>Mimus gilvus</i>	Mangue	Sangue
<i>Nannopterum brasilianus</i>	Mangue	Sangue
<i>Nyctanassa violacea</i>	Mangue	Sangue
<i>Picumnus cirratus</i>	Mangue	Sangue
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Mangue	Sangue
<i>Tachycineta albiventer</i>	Mangue	Sangue
<i>Troglodytes musculus</i>	Mangue	Sangue
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Mangue	Sangue

A captura das aves foi realizada com o uso de redes com malha de 20 mm ou 35 mm, medindo 6, 9, 12 ou 18 m de comprimento por 3 m de altura. Estas redes foram instaladas nos diferentes ambientes das áreas pré-definidas, com auxílio de hastes de alumínio e cordas. A quantidade de redes utilizadas variou conforme as condições ambientais dos locais de coleta, tendo sido utilizadas no máximo dez redes. O esforço de captura se deu pelo menos ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados. As aves capturadas foram acondicionadas em sacos de tecido específicos para contenção destes animais e levadas até a base de apoio, localizada próxima das redes. Na base, as aves foram manipuladas e identificadas, realizou-se a coleta de dados e de amostras para posterior liberação. Apesar de no TR4 estarem previstas apenas redes de 10 e 12 m, houve a necessidade de utilização

de redes com outras metragens (especificadas acima), por conta das características e condições ambientais encontradas em cada área amostral. No caso dos ambientes de mangue e estuário quando possível foram utilizadas redes de maior comprimento, porém em outras situações era impraticável e optou-se pela utilização de mais redes de menor comprimento para contornar obstáculos e ou abranger curtas dimensões como, por exemplo, corpos d'água e situações pontuais para captura de determinadas espécies. No ambiente costeiro, pela condição mais ampla da paisagem e suas características ambientais, foram utilizadas, predominantemente, redes de 12 m. Apesar da utilização de redes de menor comprimento, a quantidade utilizada foi proporcional as redes de maior comprimento, que também foram utilizadas, com isso atendemos aos esforços e os objetivos de coleta.

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

As coletas das amostras de aves foram realizadas através do recolhimento de aves encontradas mortas nas áreas amostradas e com os usos de carabinas de ar comprimido (Gamo CFX 4,5; Gamo Black Maxim 5,5; e pistola Beemam 4,5). Os esforços de coletas foram complementares e direcionados às espécies não capturadas nas redes de neblinas. Cada ave coletada individualmente e acondicionada em saco plástico e, tão logo possível, foi mantida refrigerada em caixa térmica com gelo ou congelada, até ser preparada em laboratório, onde se efetivou a coleta das seguintes amostras: sangue coagulado, tecidos do músculo peitoral, parte do fígado e um osso (fêmur). Após isso, identificou-se o sexo da ave, através da visualização das gônadas, bem como a retirada do trato digestório para separação do conteúdo estomacal, completando assim a coleta das amostras das aves mortas. Em seguida, efetivou-se a taxidermia dos espécimes. As aves taxidermizadas foram provisoriamente acondicionadas em sacos plásticos lacrados e, posteriormente, acondicionadas a seco em caixa de isopor, até o transporte para o Instituto de Ciências Biológicas da FURG, em Rio Grande/RS, onde estão armazenadas.

Para todas as aves amostradas foram feitas anotações de morfometria, muda das penas, idade, sexo, peso da ave e, quando presente, coletou-se ectoparasitas e endoparasitas. Para as aves coletadas, adicionalmente, anotou-se o peso total do conteúdo estomacal, coleta da carcaça da ave após a coleta das amostras e realizada a taxidermia da pele do indivíduo, visando o aproveitamento científico e tombamento na Coleção de Aves da FURG (CAFURG). As amostras, exceto as peles taxidermizadas,

foram mantidas congeladas. Após o encerramento da campanha, transportou-se as amostras e peles taxidermizadas, via terrestre até o Instituto de Ciências Biológicas da FURG, em Rio Grande, RS.

## 1.8 ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DE METAIS E ARSÊNIO NA BIOTA

Para o caso das amostras provenientes da campanha 6 (jul/ago 2021) e campanha 7 (mar/ 2022), as análises das concentrações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Na, Mn, Ni, Pb e Zn nas amostras biológicas foram realizadas de acordo com metodologia EPA 6020A, utilizando-se espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Analytic Jena, Alemanha). Resumidamente, as amostras de material biológico foram previamente secas em estufa (45-60°C) até peso constante e o teor de umidade foi obtido. A digestão foi realizada em um sistema de digestão por micro-ondas modelo Multiwave 3000® (Anton-Paar, França), equipado com um rotor para oito recipientes de quartzo do tipo 80 mL (operando pressão, 80 bar), utilizando-se ácido nítrico ultrapuro (Suprapur, Merck, Alemanha). Todas as amostras foram diluídas a um fator de 10 vezes utilizando-se água ultrapura (18 MΩ cm), visando adequar as concentrações dos metais e arsênio àquelas das soluções padrão certificadas, utilizadas para calibrar os equipamentos. As concentrações dos metais e arsênio no material biológico foram expressas em µg/g de peso úmido (mg/kg de peso úmido). Controle de qualidade é realizado através bancos analíticos e ensaios de recuperação com materiais de referência certificado.

## 1.9 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM AVES

As análises de compostos orgânicos (Quadro 3) foram realizadas no sangue das aves coletadas. Para a determinação de organoclorados, foram realizadas extrações de material biológico seco em *sohxlet* utilizando-se mistura hexano e diclorometano (1:1; v/v). Os padrões internos de PCB 103 e PCB 198 foram adicionados às amostras, que tiveram seu volume final reduzido para posterior purificação com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O conteúdo lipídico das amostras foi quantificado por gravimetria e as concentrações finais dos compostos organoclorados foram normalizadas a partir deste. As concentrações foram quantificadas em cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD). O controle de qualidade foi feito por análises de “brancos” e de injeção randômica de padrões certificados de referência.

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

Alíquotas das amostras biológicas foram tratadas para análise de HPAs através da liofilização, pesagem e extração em *sohxlet* com metanol, com posterior saponificação por adição de hidróxido de potássio. Posteriormente, a amostra foi transferida para um funil de separação, onde é adicionado hexano. O extrato de hexano foi então separado, por agitação manual, e recolhido em novo balão volumétrico. O procedimento é repetido três vezes, recolhendo-se todo extrato de hexano e reduzindo-o a cerca de 1mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos foram, então, purificados por *clean up* em colunas de vidro. Em seguida, adicionou-se ao extrato reduzido o padrão interno em Turbo vap, para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs se deu por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC/MS). O Quadro resume os contaminantes orgânicos analisados no sangue das aves.



Quadro 3 - Lista de contaminantes orgânicos determinados em amostras de sangue de aves coletadas pelo do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

PESTICIDAS	HPAs	PBDEs	PCBs
Trifluralina	Naftaleno	PBDE-28	PCB-28
a-HCH	Acenaftleno	PBDE-47	PCB-52
g-HCH	Acenafteno	PBDE-66	PCB-101
b-HCH	Fluoreno	PBDE-100	PCB-138
Heptacloro	Fenantreno	PBDE-99	PCB-153
Clorotalonil	Antraceno	PBDE-85	PCB-180
d-HCH	Fluoranteno	PBDE-154	
Diclofluanida	Pireno	PBDE-153	
Aldrim	Benzo(a)antraceno	PBDE-138	
b-Heptacloro Epóxido	Criseno		
a-Endossulfam	Benzo[b]fluoranteno		
o,p-DDE	Benzo[k]fluoranteno		
Dieldrin	Benzo[a]pireno		
p,p-DDE / o,p-DDD	Ieno[1,2,3-cd]pireno		
o,p-DDD	Dibenz[a,h]antraceno		
Endrin	Benzo(ghi)perileno		
p,p-DDD			
b-Endossulfam			
p,p-DDT			
o,p-DDT			
Endrin aldeído			
Endossulfam Sulfato			
Metoxicloro			
Endrin cetona			

## 1.10 ANÁLISES DE BIOMARCADORES

Biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente e podem ser mensuradas em nível molecular, celular ou fisiológico (Walker et al., 1996). Portanto, os biomarcadores selecionados para um programa de monitoramento ambiental devem detectar a exposição do organismo aos contaminantes, através de qualquer alteração biológica mensurável (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude de resposta do organismo aos contaminantes (biomarcadores de efeito). Assim, os biomarcadores foram analisados de forma seletiva nas amostras de invertebrados (pools de organismos inteiros ou tecidos), considerando-se os potenciais efeitos biológicos dos metais/As (desequilíbrio iônico e osmótico, inibição enzimática, oxidação de biomoléculas e danos morfológicos). As metodologias empregadas para as análises dos biomarcadores no ambiente costeiro estão listadas no Quadro 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 4 - Lista dos biomarcadores analisados em amostras de organismos coletados pelo Anexo 1 no ambiente costeiro.

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

#### 1.10.1 Concentração de metalotioneínas (MT)

A determinação da concentração de metalotioneínas foi realizada por meio de um kit comercial de reagentes (Fish Metallothionein ELISA Kit, fornecido pela MyBiosource), cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca. Os procedimentos analíticos para determinação da concentração de MT seguiram aqueles descritos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em µg MT/mg proteína.

#### 1.10.2 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada nas amostras do material biológico utilizando-se um método espectrofotométrico em microplaca, seguindo as recomendações do kit comercial TBARS Assay Kit, fornecido pela Chayman Chemical. Este método quantifica os danos em lipídios por meio da reação do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação ocorre em condições de acidez e alta temperatura (95°C), gerando um cromógeno fluorescente. A fluorescência gerada (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) foi medida utilizando-se um espectrofluorímetro. Calculamos os dados com base em uma curva construída com soluções padrão de MDA, sendo os resultados normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, o qual foi determinado utilizando-se o método de Bradford e expressos em nmol MDA/mg proteína.

#### 1.10.3 Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram determinados de acordo com o kit comercial de reagentes OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay, fornecido pela MyBiosource. Durante o ensaio, as proteínas carboniladas (oxidadas) foram inicialmente derivatizadas com um fluoróforo específico que se liga ao grupo carbonila da proteína, na proporção de 1:1. Após isto, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) e o fluoróforo livre removido após a lavagem do precipitado proteico.

com acetona. Após a solubilização do precipitado proteico em hidrocloreto de guanidina, a absorbância do produto proteína-fluoróforo foi determinada fluorimetricamente (emissão: 485; excitação: 538 nm) e o conteúdo de proteínas carboniladas calculado. Os resultados foram expressos em nmol PC/mg proteína.

#### 1.10.4 Danos de DNA

Para a análise de sítios AP (sítios apurínicos/apirimídicos) no material genético, o DNA genômico foi previamente isolado utilizando-se um kit de reagentes para isolamento de DNA (DNA isolation kit, fornecido pela PromoKine, Promocell©). A análise propriamente dita de sítios AP foi realizada, utilizando-se uma sonda capaz de reagir com o grupo aldeído destes sítios, a qual foi detectada por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para tal, foi utilizado um kit de reagentes de detecção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (DNA Damage Detection Kit, fornecido pela Promokine, Promocell©; ou outro kit similar). Os resultados foram expressos em sítios AP/10<sup>5</sup> pares de bases (bp).

#### 1.11 ÍNDICE DE IMPACTO ECOTOXICOLÓGICO (IIE)

Quadro 5 - Descrição metodológica do Índice de Impacto Ecotoxicológico (IIE). Os níveis e respectivos valores foram atribuídos de acordo com o tipo de resposta biológica (do menor para o maior): bioacumulação (contaminação dos organismos) e biomarcador (resposta biológica de exposição e efeito em nível orgânico).

Níveis ecotoxic.	Descrição de cada critério	Cálculo de cada critério	Peso de cada critério	Cálculo do IIE por nível	IEE Máximo
<b>Nível 1</b> Bioacumulação (25%)	<b>IBR Bioacumulação:</b> Normalizado pelo valor máximo de ocorrência entre Campanhas e setores.	$IBR_{\text{caranguejos manguezais}} / IBR_{\text{máx}}$	$C1 * 8,3\%$	$\Sigma(c1*8,3\%)$	25
		$IBR_{\text{caranguejo de praia}} / IBR_{\text{máx}}$	$C1 * 8,3\%$		
		$IBR_{\text{outros invertebrados}} / IBR_{\text{máx}}$	$C1 * 8,3\%$		
<b>Nível 2</b> Biomarcador (75%)	<b>IBR Biomarcador:</b> Normalizado pelo valor máximo de ocorrência entre Campanhas e setores.	$IBR_{\text{caranguejos manguezais}} / IBR_{\text{máx}}$	$C2 * 25\%$	$\Sigma(c2*25\%)$	75
		$IBR_{\text{caranguejo de praia}} / IBR_{\text{máx}}$	$C2 * 25\%$		
		$IBR_{\text{outros invertebrados}} / IBR_{\text{máx}}$	$C2 * 25\%$		

Classificação IIE	Não impactado	Levemente Impactado	Moderadamente Impactado	Impactado	Altamente Impactado
	<1	$1 \leq IIE < 15$	$15 \leq IIE < 50$	$50 \leq IIE < 75$	$75 \leq IIE \leq 100$

## 2 REFERÊNCIAS

NADELLA, S.R., FITZPATRICK, J.L., FRANKLIN, N., BUCKING, C., SMITH, S., WOOD, C.M. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. **Comparative Biochemistry and Physiology C.**, 149. 340-348, 2009.

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

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

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

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