

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

A1CS1 – Material Suplementar 1

Anexo 1 – Ecotoxicologia/Costeiro

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/Fest-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2022

1 ANEXO 1 – METODOLOGIA GERAL DO AMBIENTE COSTEIRO - RELATÓRIO ANUAL 2021 (PMBA/Fest-RRDM)

1.1 MALHA AMOSTRAL

Conforme definido no TR4 e, posteriormente, na Nota Técnica nº3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, o monitoramento ecotoxicológico do ambiente costeiro foi realizado sazonalmente (inverno/período seco e verão/período chuvoso) a partir da análise de amostras de água, sedimento e biota coletadas durante o Ano 1 (Campanha 1 - set/out 2018 e Campanha 2 - jan/fev 2019), Ano 2 (Campanha 3 - set/out 2019 e Campanha 4 - jan/fev 2020) e Ano 3 (Campanha 5 – jan/fev 2021 e Campanha 6 – jul/ago 2021).

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 praiar 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-açu - Aracruz (ES), e costa adjacente à foz do Rio Doce Norte e Sul. Os pontos de coleta das aves durante as campanhas 5 (jan/fev 2021) e 6 (jul/ago 2021) são demonstrados no Quadro 3 e Quadro 4, respectivamente.

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).

Quadro 3 - Locais de coletas de aves durante a Campanha 5 (jan/fev 2021) do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

Município/ Estado	Setor	Localidade	Coordenadas (DATUM WGS 84)
Mangue	A	Foz do rio Piraquê-açu	19°55'25.67"S; 40°10'46.5357"W
			19°55'31.92"S; 40°10'57.65"W

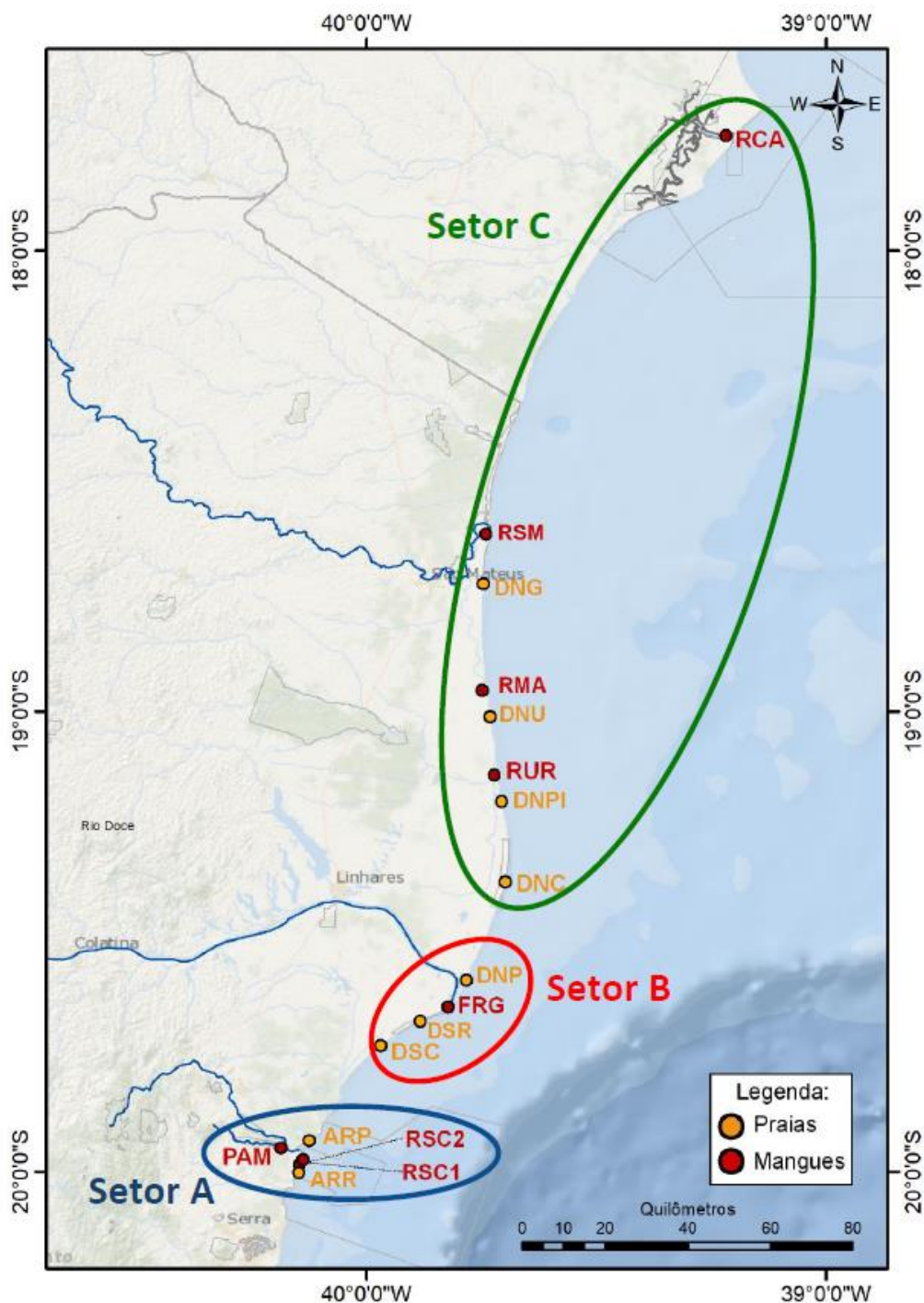
Município/ Estado	Setor	Localidade	Coordenadas (DATUM WGS 84)
			19°56'59.82"S, 40°09'17.52"W
		Pontal Piraquê-açu	19°57'0.28"S, 40° 9'23.98"W
			19°57'0.44"S, 40° 9'19.70"W
		Foz do rio Piraquê-açu	19°57'00.09"S, 40° 09'16.56"W
		Pontal Piraquê-açu	19°57'00.18"S, 40°09'19.42"W
			19°57'00.94"S, 40°09'24.03"W
			19°57'01.00"S, 40°09'24.79"W
			19°57'1.24"S, 40° 9'19.87"W
		Foz do rio Piraquê-açu	19°57'17.75"S, 40°10'17.91"W
			19°57'7.60"S, 40° 09'49.3"W
Estuário	B	Foz do rio Doce, Regência Augusta	19°36'40.62"S; 39°48'37.65"W
			19°36'56.68"S; 39°48'55.80"W
			19°37'15.71"S; 39°49'04.69"W
			19°37'57.13"S; 39°49'23.89"W
			19°38'19.45"S; 39°48'58.14"W
			19°38'22.75"S; 39°48'57.02"W
			19°38'40.24"S; 39°49'04.30"W
			19°38'45.19"S; 39°48'44.13"W
			19°39'05.49"S; 39°48'59.00"W
		Regência Augusta	19°39'38.14"S; 39°51'31.74"W
Costeiro	C	APA Conceição da Barra, Praia de Guriri	18°36'10.53"S; 39°44'06.51"W
			18°36'13.03"S; 39°43'52.54"W
			18°36'14.72"S; 39°44'02.68"W
			18°36'14.72"S; 39°44'02.68"W

Quadro 4 – Locais de coletas de aves durante a Campanha 6 (jul/ago 2021– período seco) do Anexo 1 do PMBA/Fest-RRDM.

Município/ Estado	Setor	Localidade	Coordenadas (DATUM WGS 84)
Mangue	A	Pontal Piraquê-açu	19°56'18.13"S, 40°10'29.46"W
			19°56'37.96"S, 40°11'40.47"W
			19°56'44.91"S, 40°10'45.57"W
			19°56'53.45"S, 40°08'48.04"W
			19°56'55.70"S, 40°10'15.37"W
			19°56'59.69"S, 40°09'18.26"W
			19°57'10.07"S, 40°09'54.21"W
			19°56'59.99"S, 40°09'19.16"W
			19°57'00.18"S, 40°09'19.42"W
			19°57'01.03"S, 40°09'24.24"W
			19°56'59.45"S, 40°09'24.46"W
		Foz do Piraquê-açu	19°57'11.21"S, 40°10'23.51"W
			19°57'21.03"S, 40°09'57.58"W

Município/ Estado	Setor	Localidade	Coordenadas (DATUM WGS 84)
			19°57'03.90"S, 40°08'29.89"W
Estuário	B	Estuário da Foz Rio Doce, Regência Augusta	18°36'36.73"S, 39°44'15.05"W
			19°36'20.00"S, 39°48'20.50"W
			19°36'21.31"S, 39°48'23.37"W
			19°36'32.88"S, 39°48'31.99"W
			19°36'41.08"S, 39°48'34.77"W
			19°36'43.90"S, 39°48'36.55"W
			19°36'58.25"S, 39°48'59.51"W
			19°38'03.18"S, 39°49'27.86"W
			19°38'26.94"S, 39°49'29.44"W
			19°36'42.91"S, 39°48'42.58"W
			19°36'40.50"S, 39°48'34.45"W
			19°36'42.98"S, 39°48'40.45"W
			19°36'42.91"S, 39°48'42.58"W
			19°36'53.52"S, 39°48'46.46"W
Costeiro	C	APA Conceição da Barra	19°57'05.52"S, 40°09'31.29"W
			18°35'53.67"S, 39°44'05.10"W
			18°36'08.28"S, 39°43'59.93"W
			18°36'10.86"S, 39°43'55.55"W
			18°36'13.24"S, 39°43'51.43"W
			18°36'15.61"S, 39°43'50.67"W
			18°36'22.56"S, 39°43'49.98"W
			18°36'27.40"S, 39°44'03.49"W
			18°36'35.26"S, 39°44'13.47"W
			18°36'36.73"S, 39°44'15.05"W
			18°36'22.02"S, 39°43'59.92"W
			18°36'23.69"S, 39°44'02.80"W

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



1.2 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

Como previsto no TR4, foram coletadas amostras de água nas estações amostrais de mangue e praia. As coletas de água, ao longo da coluna d'água, foram realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal *Van Dorn*. Em todas as estações amostrais foram coletadas amostras de água para a análise das

concentrações de metais totais e amostras de água filtrada para a análise das concentrações de metais dissolvidos. Imediatamente após a coleta, alíquotas das amostras foram acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) e mantidas refrigeradas para a determinação das concentrações totais e dissolvidas de metais. As amostras de água foram analisadas para 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). 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, foi considerado dentro do grupo dos metais para as análises integradas.

1.3 ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

No momento da coleta de amostras de água, foram realizadas as medidas de temperatura, condutividade elétrica, salinidade, pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetros (YSI Professional Plus). A concentração de carbono orgânico dissolvido foi determinada nas amostras de água filtradas (0,45 µm de malha) utilizando-se um analisador de carbono total (TOC). Os demais parâmetros químicos foram determinados nas amostras de água não filtradas. A concentração de sulfatos foi determinada por meio de um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Sulfato, CHEMetrics, EUA), baseado no método turbidimétrico (Tabatabai, 1974). A alcalinidade total foi determinada por titulação com solução padrão ácida, empregando-se um kit comercial de reagentes (Teste de Campo Titulométrico de Alcalinidade, Merck Millipore Brazil, Brasil), baseado no método titrimétrico (APHA, 1989). A composição iônica (concentrações de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ e Na⁺) foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. A concentração de cloretos foi analisada por meio de um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Cloreto, CHEMetrics, EUA), baseado no método do tiocianato férrico.

1.4 COLETA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO

Em todas as estações amostrais de mangue e praia, foram também coletadas amostras de sedimento com auxílio de uma pá. 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. Para a análise de metais, as amostras foram separadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5 cm) da amostra de sedimento, obtendo-se, assim, somente o sedimento superficial. Para cada amostra, foram coletados aproximadamente 50 g de sedimento, que foram armazenados em potes plásticos e mantidos congelados até o momento das análises. As amostras de sedimento foram analisadas para 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).

1.5 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 praia 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.

1.6 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 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 Maxxim 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.

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

Descrição das metodologias aplicadas até a Campanha 5 (jan/fev 2021 – período chuvoso):

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 aves (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 Mercúrio (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 o caso das amostras de água, estas foram previamente 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 tal, analisamos "brancos", onde todos os procedimentos de preparo e análise das amostras foram igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, foram utilizadas 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 plástico uma alíquota de 1g do sedimento coletado e lavá-lo, para eliminar interferentes salinos, com água ultrapura. Após isso, 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), 4 (jan/fev 2020) e campanha 5 (jan/fev 2021) as amostras de sedimento

foram congeladas e liofilizadas. Em seguida, foram submetidas ao processo de extração conforme EPA 3051A que, resumidamente, consistiu na pesagem de 0,25 g de sedimento macerado (gral e pistilo de ágata), adição de 10 ml de HNO_3 (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 Ano 2 e parte do 3 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 HNO_3 (Suprapur®, Merck) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de HNO_3 e, assim, o teor de água, para cada amostra, calculado. Dessa maneira, as amostras foram submetidas 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 $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (mg/kg de peso úmido) ou $\mu\text{g/g}$ de peso seco (mg/kg de peso seco).

Descrição das metodologias aplicadas na Campanha 6 (jul/ago 2021 – período seco):

Para o caso das amostras provenientes da Campanha 6 (jul/ago 2021), as análises das concentrações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Na, Mn, Ni, Pb e Zn 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 HNO_3 ultrapuro (Suprapur, Merck, Alemanha). Todas as amostras foram diluídas a um fator de 10 vezes utilizando-se água ultrapura (18 M Ω cm), visando adequar as concentrações dos metais e arsênio àsquelas das soluções-padrão certificadas, utilizadas para calibrar os equipamentos. As concentrações dos metais e arsênio no material biológico foram expressas em $\mu\text{g/g}$ 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.

Para a extração dos metais totais e dissolvidos nas amostras de água foi utilizado o método EPA 3015A. A quantificação dos elementos analisados foi realizada pelo método EPA 6020A. O controle de qualidade foi realizado através de participação em programas de proficiência para matriz água, bancos analíticos e ensaios de recuperação com materiais de referência certificado.

As amostras de sedimentos superficiais coletadas foram congeladas e liofilizadas para posteriormente serem maceradas e homogeneizadas utilizando gral e pistilo de ágata. O processo de extração foi realizado de acordo com o método da EPA 3051 para determinação da fração disponível. A determinação destes elementos atendeu as descrições presentes no método EPA 6020A. O controle de qualidade foi realizado através bancos analíticos e ensaios de recuperação com materiais de referência certificado.

1.8 ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM AVES

As análises de compostos orgânicos foram realizadas no sangue das aves coletadas (Quadro 1 A1CS2). 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_2SO_4 . 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 5 resume os contaminantes orgânicos analisados no sangue das aves.

Quadro 5 - 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		
Dieldrim	Benzo[a]pireno		
p,p-DDE / o,p-DDD	Ieno[1,2,3-cd]pireno		
o,p-DDD	Dibenz[a,h]antraceno		
Endrim	Benzo(ghi)perileno		
p,p-DDD			
b-Endossulfam			
p,p-DDT			
o,p-DDT			
Endrim aldeído			
Endossulfam Sulfato			
Metoxicloro			
Endrim cetona			

1.9 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 6 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 6 - 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)

1.9.1 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.

1.9.2 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.

1.9.3 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.

1.9.4 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/10⁵ pares de bases (bp).

Quadro 7 - 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 organismo).

Níveis ecotoxic.	Descrição de cada critério	Cálculo de cada critério	Peso de cada critério	Cálculo do IIE por nível	IEE Máximo
Nível 1 Bioacumulação (25%)	IBR Bioacumulação: 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
		$IBR_{\text{caranguejo de praia}} / IBR_{\text{máx}}$	$C1 * 8,3\%$		
		$IBR_{\text{outros invertebrados}} / IBR_{\text{máx}}$	$C1 * 8,3\%$		
Nível 2 Biomarcador (75%)	IBR Biomarcador: 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**. Valinos, 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.