

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

A5MS1 – Material Suplementar 1

Anexo 5 - Manguezal

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/Fest-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2022

SUMÁRIO

1	METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE.....	3
1.1	CARACTERIZAÇÃO MINERALÓGICA DOS SEDIMENTOS.....	3
1.1.1	Coleta das amostras.....	3
1.1.2	Granulometria	3
1.1.3	Matéria Orgânica.....	4
1.1.4	Carbonato de Cálcio	5
1.1.5	Metais	5
1.2	ANÁLISE FOLIAR DE MACRO E MICRONUTRIENTES	5
1.2.1	Coleta e processamento de amostras foliares	5
1.2.2	Análise estatística.....	6
1.3	ATIVIDADE ANTIRRADICALAR	6
1.3.1	Coleta e processamento de amostras foliares	6
1.3.2	Análises em laboratório (DPPH).....	7
1.4	PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES	8
1.4.1	Coleta de folhas	8
1.4.2	Extração dos pigmentos	8
1.4.3	Análise em espectrofotometria	8
1.5	ANÁLISES FOTOSSÍNTÉTICAS	9
1.5.1	Material vegetal e condições de amostragem	9
1.5.2	Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	10
1.5.3	Assimilação de CO ₂ e trocas gasosas.....	10
1.5.4	Análise estatística.....	10
1.6	DIAGNÓSTICO SOBRE A FAUNA DO MANGUEZAL, COMPARTIMENTO CARANGUEJOS	11
1.6.1	Desenho amostral.....	11
1.6.2	Procedimentos em laboratório.....	12
1.6.3	Análises estatísticas.....	13

1.6.4	Fecundidade	15
1.6.5	Diversidade.....	15
2	REFERÊNCIAS	16

1 METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE

1.1 CARACTERIZAÇÃO MINERALÓGICA DOS SEDIMENTOS

1.1.1 Coleta das amostras

As amostras de sedimento foram coletadas semestralmente nas zonas entremarés dentro dos manguezais, por meio de coletores constituídos por um tubo de PVC de 50 cm marcado com as profundidades de 0-5 e 5-15 cm. Os períodos de coleta foram: dezembro 2018 e janeiro 2019 (chuvoso 2018/2019), junho e julho 2019 (seco 2019), outubro 2019 (chuvoso 2019/2020) e janeiro e fevereiro/2020 (chuvoso 2019/2020), janeiro 2021 (chuvoso 2021), maio 2021 (seco 2021 – dados ainda não disponíveis) e agosto 2021 (seco 2021 – dados ainda não disponíveis). Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados, mantidos em temperatura controlada e levados para o laboratório e armazenados sob refrigeração a 10° C negativos.

As amostras de sedimentos foram coletadas em todos dos pontos propostos. A saber:

Aracruz (Rio Piraquê-Açu e Rio Piraquê-Mirim); Barra do Riacho; Regência; Urussuquara; Barra Nova; São Mateus, Conceição da Barra, Costa das Algas Caravelas. Em todos os pontos de amostragem foram coletados sedimentos, na margem esquerda e direita (quando havia), na parte de franja e bacia (quando havia) em três pontos e duas profundidades, totalizando 132 amostras em cada período de amostragem.

Tabela 1: Coordenadas geográficas das estações de coleta.

Nome da estação	Código da estação amostral	Número de amostras	Localidade	S	W
Rio Piraquê-Açu	- PA	24	Aracruz-ES	19°57'45"S	40°08'48"W
Rio Piraquê-Mirim	- PM	24	Aracruz-ES	19°57'45"S	40°08'48"W
Barra do Riacho	- BR	6	Barra do Riacho	19°49'46"S	40°03'49"W
Regência	- RE	6	Regência	19°38'42"S	39°49'19"W
Urussuquara	- UR	8	Urussuquara	19°07'37"S	39°43'20"W
Barra Nova	- BN	12	Barra Nova	18°57'03"S	39°44'23"W
Meleiras	- SM	12	São Mateus-ES	18°37'01"S	39°45'30"W
Conc. da Barra	- CB	12	Conc.da Barra-ES	18°37'06"S	39°48'53"W
Costa das Algas	- CA	4	Aracruz - ES	19°58'23"S	40°08'15"W
Caravelas	- CV	24	Caravelas-BA	17°45'17"S	39°16'58"W

1.1.2 Granulometria

Em laboratório foram separados cerca de 50 gramas da amostra bruta para a análise granulométrica. Primeiramente, foi feito a lavagem da amostra com água para a retirada dos sais por meio da técnica

de decantação em Becker de 1 L por três vezes. Posteriormente, foi feito a separação das frações grossa (areia + cascalho) e fina (silte + argila), na qual procede-se colocando a amostra lavada em peneira com abertura igual a 63 µm sob água corrente.

O Becker contendo a fração fina foi deixado em repouso até completa deposição do sedimento em suspensão. Após a decantação, o excesso de água foi drenado cuidadosamente com uma mangueira e a amostra seguiu para remoção da matéria orgânica total por queima com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 30%. Em capela de exaustão de gases, posicionou-se o Becker contendo a fração fina sobre uma chapa aquecedora (à 70°C) e adicionou-se delicadamente (reação forte) o H₂O₂ à amostra com o auxílio de pisseta até que ocorresse a reação. Após adição do H₂O₂, deixou-se o Becker sobre a chapa aquecedora ligada por, no mínimo, 6h para digestão completa. Terminadas as 6h, foi checado se o sedimento ainda estava reagindo (borbulhar) com a adição de mais H₂O₂. O procedimento de queima continuou até que não houve mais reação (borbulhamento) com a adição de mais H₂O₂ ao sedimento. Terminada a queima, a amostra foi lavada três vezes no próprio Becker seguindo o mesmo procedimento descrito para a remoção de sal (lavagem seguida de decantação). Nestas amostras, a fração lama foi analisada empregando-se o granulômetro a laser, Mastersizer 2000 da Malvern Instruments de acordo com a metodologia adaptada de Dias (2004).

O Becker contendo a fração grossa (após a água ser drenada) foi levado à estufa a 40°C para secagem da amostra. Após seco, o sedimento foi pesado e seguiu para o fracionamento via seca. A fração areia foi passada pelo peneiramento a seco, que consiste em utilizar conjunto de peneiras com telas de malhas de 2 mm a 0,063 mm colocadas em um agitador mecânico durante 15 minutos. Após peneiramento cada porção do sedimento de acordo com sua granulometria foi pesado e planilhado. A escala granulométrica utilizada foi a de Wentworth (1922), em que as frações maiores que 0,063 mm são classificadas como areias/grânulos e as menores, como silte/argila (SUGUIO, 1973).

1.1.3 Matéria Orgânica

O teor de matéria orgânica (MO) presente nos sedimentos foi mensurado por meio do método de calcinação, que consiste na queima da MO em altas temperaturas. Para isso, foram pesadas 2 g de cada amostra de sedimento. Essas amostras pesadas foram colocadas em cadinhos de porcelana e submetidas à temperatura de 450 °C na mufla, durante 4 horas. A massa de MO é definida pelo peso do sedimento antes da queima na mufla subtraído do peso após a queima na mufla segundo método modificado Goldin (1987). O teor é a conversão deste valor em porcentagem, podendo-se encontrar a concentração de MO presente nas amostras por meio do cálculo:

$$MOT = \frac{Pf \times 100}{Pi}$$

Onde *Pf* é o peso final e *Pi* é o peso inicial das amostras.

1.1.4 Carbonato de Cálcio

Cerca de 20 g da amostra bruta liofilizada foi pesada e transferida para um Becker previamente pesado. Após, o Becker contendo o sedimento seco e já pesado foi colocado em uma capela de exaustão de gases para a adição lenta e gradual de HCl (30%) com o auxílio de piseta. O procedimento continua até que a adição de HCl não provoque mais reação (borbulhamento). Terminada a queima do carbonato, o sedimento foi lavado três vezes com água e seco em estufa à 40°C. Após seco, o Becker com o sedimento foi novamente pesado e o teor de carbonato de cálcio é o sedimento pré-queima subtraído do sedimento pós-queima corrigido para porcentagem, conforme método primeiramente reportado por Gross (1971).

1.1.5 Metais

A análise de metais em sedimentos foi realizada segundo método US EPA 3051A (USEPA, 2013), que preconiza a digestão de cerca de 0,50 g de solo, seco e homogeneizado, em 10 mL de HNO₃ em tubos de Teflon com o uso do forno micro-ondas (CEM, MARX X-PRESS) seguindo os seguintes parâmetros: 1ª rampa de temperatura 25°C a 175°C em 5:30min. e a 2ª rampa de 25°C a 175°C em 4:30min., ambas em potência de 1600 W. A solução foi então resfriada e filtrada utilizando o filtro Whatman n° 1 e diluída para 100 ml num balão volumétrico e as soluções analisadas pelo ICP -MS (Espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada; Agilent, CX7500). Os elementos analisados pelo ICP-MS foram: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V e Zn. Material de referência (SS-2, Enviro MATTM) foi analisado para certificação do método e porcentagens de recuperação desses elementos.

1.2 ANÁLISE FOLIAR DE MACRO E MICRONUTRIENTES

1.2.1 Coleta e processamento de amostras foliares

Foram realizadas coletas de amostras de folhas de 4 espécies vegetais: *Avicennia schaueriana* (Av); *Laguncularia racemosa* (Lg); *Rhizophora mangle* (Rh) *Talipariti pernambucense* (Tp), de acordo com sua ocorrência nos manguezais de 9 localidades: Piraquê Açú (PA), Piraquê Mirim (PM), Costa das Algas (CA), Barra do Riacho (BR), Rio Doce (RD), Urussuquara (UR), Barra Nova (BN), São Mateus (SM) e Caravelas (CR), nos estados do Espírito Santo e Bahia. Foram coletados em bosques do tipo franja e bacia nas margens esquerda e direita dos estuários. O período de amostragem foi entre janeiro de 2019 e agosto de 2021.

A amostragem seguiu o seguinte protocolo: realizar a coleta manualmente com as mãos limpas, sem necessidade de luvas; retirar 20 folhas maduras completamente expandidas de cada indivíduo amostrando cerca de cinco plantas por estação para obtenção de amostras compostas com aproximadamente 40 g.

Após a coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos de papel identificados de acordo com cada estação amostral. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante. Em seguida as folhas foram moídas em moinho tipo Wiley (Marca Tecnal; modelo TE650/1) com peneiras de malha 20 e enviadas para a análise química para determinação de macro e micronutrientes. Para a análise foliar foram considerados os seguintes nutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Co) e boro (B). Também foram analisados os elementos chumbo (Pb) e alumínio (Al).

O N-total foi determinado pelo método Kjeldahl, descrito por Bremner (1965). Os demais elementos foram analisados após mineralização pela digestão nítrico-perclórica. O B foi determinado colorimetricamente pelo método da Azometina H (WOLF, 1974), após a mineralização por via seca em mufla a 550°C. O P foi dosado colorimetricamente pelo método de redução do fosfomolibdato pela vitamina C, de acordo com Braga e Defelipo (1974); o K, por fotometria de emissão de chama; o Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu, por espectrofotometria de absorção atômica; e o S determinado por turbidimetria do sulfato (BLANCHARD et al., 1965).

1.2.2 Análise estatística

Os dados de concentrações de macro e micronutrientes foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Os dados apresentaram distribuição não-paramétrica. Logo, as comparações entre os estuários, entre as espécies e entre os períodos (seco e chuvoso) foram determinadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas a posteriori (Teste de Dunn) (ZAR, 1996). Os programas Excel e o pacote de tratamento estatístico Statistica (STATSOFT®) foram utilizados nas análises supracitadas.

1.3 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR

1.3.1 Coleta e processamento de amostras foliares

Amostragem em campo (mesmos pontos de coleta para análise foliar de macro e micronutriente).

A amostragem seguiu o seguinte protocolo: realizar a coleta manualmente com as mãos limpas, sem necessidade de luvas; retirar 20 folhas maduras completamente expandidas de cada indivíduo amostrando cerca de cinco plantas por estação para obtenção de amostras compostas com aproximadamente 40 g.

Após a coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos de papel identificados de acordo com cada estação amostral. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante. Em seguida as folhas foram moídas em moinho tipo Wiley (Marca Tecnal; modelo TE650/1) com peneiras de malha 20 e enviadas para a análise química para determinação da atividade antirradicalar. O período de amostragem foi entre janeiro de 2019 e agosto de 2021.

1.3.2 Análises em laboratório (DPPH)*

As amostras de folhas secas e moídas foram pesadas ($\pm 0,5000$ ou $\pm 1,0000$ g cada) em balança analítica (BIOPRECISA, modelo Fa2104n, acurácia de 4 casas decimais) utilizando papel de pesagem e transferidas individualmente para tubos Falcon de 15 mL previamente identificados. Após, foram adicionados 5 mL de metanol (HPLC PAI-ACS, marca Panreac) em cada tubo Falcon utilizando uma pipeta automática (NAVELAB). Os tubos Falcon foram fechados e colocados em banho ultrassônico (SANDERS, modelo Soniclean 2) a 40 KHz por 160 minutos para extração. A cada 40 minutos os tubos Falcon eram retirados do banho e agitados durante 30 segundos em um agitador de tubos. Em seguida, os tubos Falcon foram colocados em uma centrífuga de bancada (NOVA INSTRUMENTS, modelo NI1811-A) e centrifugados a 3400 rpm durante 20 minutos. O extrato sobrenadante dos tubos Falcon centrifugados foram transferidos para tubos de ensaio de 15 mL previamente identificados e de massa conhecida. A seguir, os tubos de ensaio foram postos em estufa de secagem (DELEO, modelo A5SE) a 50°C até evaporação total do solvente metanol e até apresentação de massa constante de extrato seco na pesagem. Os tubos de ensaio com o extrato seco foram pesados novamente e então adicionados 5 ou 10 mL de metanol (dependendo da massa inicial) utilizando uma pipeta automática. Os tubos com o extrato seco foram colocados em banho ultrassônico por 5 minutos até total dissolução do extrato no solvente.

Para os testes de atividade antioxidante com DPPH* todas as soluções metanoicas dos extratos secos foram diluídas em metanol (duas, cinco, dez ou vinte vezes), para que a absorbância medida se mantenha dentro da faixa de trabalho. As soluções já diluídas foram denominadas como soluções de trabalho (ST). Os ensaios foram realizados adicionando alíquotas de 15 μ L, 25 μ L e 35 μ L de cada ST, em cubetas contendo 3,0 mL de solução metanoica de DPPH* 0,2 mmol.L⁻¹ e a reação foi mantida ao abrigo da luz durante 60 minutos antes das medidas espectrofotométricas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro Lambda 16 da marca Perkin Elmer, monitorando a absorbância das amostras em 517 nm. Os brancos consistem em 3,0 mL de metanol contendo 15 μ L, 25 μ L ou 35 μ L da respectiva ST. O controle negativo foi uma solução contendo apenas DPPH 0,2 mmol.L⁻¹ em metanol.

O cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH* foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibida} = \left(1 - \frac{[A(a) - A(b)]}{[A(c) - A(b)]} \right) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Onde A(a) é a absorbância da amostra, A(b) é a absorbância do branco, e A(c) é a absorbância do controle negativo.

A partir das porcentagens inibidas para cada concentração, foram determinados os valores de IC50 (concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH*), por meio de regressão linear. Como todas as análises foram realizadas em triplicata, foram utilizados a média e o desvio padrão para representar o IC50 de cada amostra (Apêndice).

1.4 PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES

1.4.1 Coleta de folhas

A coleta das folhas foi realizada nos diferentes estuários (Piraquê Açú, Piraquê Mirim, Costa das Algas, Rio Doce, Barra do Riacho, Urussuquara, Barra Nova, São Mateus e Caravelas) com as seguintes espécies: *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia schaueriana* e *Talipariti pernambucense*. As amostras coletadas foram colocadas em sacos de papel kraft, previamente identificados, e armazenadas em gelo até a chegada ao Laboratório de Ecologia de Manguezais. Todo o material foi imediatamente armazenado em freezer à -30°C até o momento da extração. O período de amostragem foi entre outubro/2019 e fevereiro/2020 (mesmos pontos de coleta para análise foliar de macro e micronutriente).

1.4.2 Extração dos pigmentos

Amostras de 5 g de massa fresca congeladas à -30°C foram trituradas em nitrogênio líquido (N₂) até formar um pó fino, o qual foi transferido para tubos de ensaio. A este pó foi adicionado 15 mL de solução de acetona 90% + de 0,5 g.L⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO₃). Imediatamente após esse processo, os tubos de ensaio foram acondicionados em temperatura de 2°C por 24h para extração completa dos pigmentos (modificado de ARAR, 1997). A partir daí as amostras foram filtradas e o sobrenadante armazenado em frascos âmbar à -30°C até a análise por espectrofotometria.

O procedimento de extração foi realizado de forma que os efeitos da luz, da temperatura e da ação enzimática sobre a degradação da clorofila fossem minimizados. As vidrarias contendo as amostras foram protegidas contra a luz e os solventes de extração foram utilizados gelados. O tempo de extração foi mantido ao seu mínimo possível, diminuindo assim a possibilidade de degradação dos pigmentos analisados. Os tubos de ensaio foram vedados com papel alumínio e mantidos em gelo.

1.4.3 Análise em espectrofotometria

O procedimento de extração dos pigmentos ocorreu como descrito acima. Posteriormente, foram determinadas as leituras da densidade ótica em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 470nm, 645nm e 663nm. As determinações das concentrações dos pigmentos fotossintéticos foram realizadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) e expressas em mg mL⁻¹ de massa fresca:

$$\text{Clorofila } a = (12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{645})$$

$$\text{Clorofila } b = (21,5 \times A_{645} - 5,1 \times A_{663})$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{Clor } a - 85,02 \times \text{Clor } b/198)$$

Onde: A470 = absorvância em 470 nm; A645 = absorvância em 645 nm; A663 = absorvância em 663 nm.

1.5 ANÁLISES FOTOSSÍNTÉTICAS

1.5.1 Material vegetal e condições de amostragem

Para as medições da produtividade primária (fluorescência da clorofila *a* e assimilação de CO₂), definiu-se um padrão de amostragem, consistindo na aquisição dos dados em 6 folhas consideradas jovens e completamente expandidas, sem indícios de senescência. Para atender a este padrão, foram amostradas as folhas do 2º par a partir do ápice para a base do ramo. Estas réplicas foram obtidas de 5 indivíduos jovens (amostras) de *Rhizophora mangle* com até 2 metros de altura. Entretanto, quando da ausência dessa espécie na parcela, foi selecionada aquela dominante (*Laguncularia racemosa*, *Avicennia schaueriana* e *Talipariti pernambucense*), seguindo o mesmo padrão de amostragem (Quadro 1). Estes indivíduos receberam um lacre de identificação, o que possibilitou monitorar a produção primária dos mesmos bimestralmente (Ano 1) e trimestralmente (Transição). A aquisição dos dados foi feita sempre pela manhã, no mesmo intervalo de tempo (entre 7 e 12 horas) em todas as parcelas.

Quadro 1: Espécies amostradas nas análises fotossintéticas por área/estação ao longo do PMBA.

Área	Estações	Espécie
Piraquê-Açu	Todas	<i>R. mangle</i>
Piraquê-Mirim	Todas	<i>R. mangle</i>
Costa das Algas	CA1	<i>A. schaueriana</i>
Costa das Algas	CA2	<i>R. mangle</i>
Barra do Riacho	Todas	<i>R. mangle</i>
Rio Doce	Todas	<i>T. pernambucense</i>
Urussuquara	UR1FE	<i>R. mangle</i>
Urussuquara	UR2FD, UR3FE e UR3BE	<i>L. racemosa</i>
Barra Nova	BN1FE, BN1BE, BN2FD, BN2BD, BN3BD	<i>R. mangle</i>
Barra Nova	BN3FD	<i>L. racemosa</i>
São Mateus	SM1FD, SM1BD, SM2FD, SM1FE, SM1BE, SM2FE, SM2BE, SM3FE, SM3BE	<i>R. mangle</i>
São Mateus	SM3FE, SM3BE	<i>L. racemosa</i>
Caravelas	CR1FD, CR1BD, CR2FD, CR3BD, CR1FE, CR1BE, CR2FE, CR2BE, CR3FE	<i>R. mangle</i>
Caravelas	CR2BD, CR3BE	<i>L. racemosa</i>
Caravelas	CR3FD	<i>A. schaueriana</i>

1.5.2 Fluorescência da Clorofila *a*

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas utilizando-se um fluorômetro portátil Handy-PEA (Hanstech Instruments Ltd., King's Lynn, Norkfolk, UK). As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos (FALQUETO et al., 2008) utilizando-se cliques foliares (Hansatech Instruments, UK) para a oxidação completa da cadeia de transporte de elétrons. A intensidade de fluorescência em 50 μ (considerado como F0), 100 μ s, 300 μ s, 2 ms (FJ), 30 ms (FI) e a fluorescência máxima (Fm) foram registradas e utilizadas para os cálculos dos parâmetros do teste JIP de acordo com Strasser et al. (2004) e Stirbet e Govindjee (2011). O parâmetro indicador utilizado no relatório foi PI_{Total} – índice de conservação de energia dos fótons absorvidos pelo fotossistema II (FSII) para a redução dos aceptores finais do fotossistema I (FSI), uma vez que é considerado um dos parâmetros mais sensíveis para medir a eficiência quântica do FSII (SMIT et al., 2009).

1.5.3 Assimilação de CO₂ e trocas gasosas

Para as medidas da assimilação de CO₂ utilizou-se um medidor portátil de fotossíntese (Infrared gas analyzer, IRGA) modelos LCi, LCi T e Lcpro T (ADC, Bio Scientific Ltd. Hoddesdon, England). O parâmetro analisado como indicador neste relatório foi assimilação de CO₂ (A - μ mol m⁻² s⁻¹).

1.5.4 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett). Os parâmetros fisiológicos que não apresentaram normalidade foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis para as comparações entre os períodos (seco e chuvoso) para cada estuário, seguido do teste de comparações múltiplas *a posteriori* (Teste de Dunn) (ZAR, 1996). Já os parâmetros fisiológicos que apresentaram normalidade foram submetidos ao teste ANOVA, seguido do teste post-hoc Tukey. A região onde estão inseridas as áreas de estudo, região tropical, é caracterizada por um período seco (abril a setembro) e período chuvoso (outubro a março) (NOBREGA et al., 2010; RRDM, 2019 RT 21, Anexo 5 Manguezal). Nas análises estatísticas básicas empregou-se Excel ou o pacote de tratamento estatístico Statistica (STATSOFT®).

Análise de Componentes Principais separadas por espécie foi obtida por ano de monitoramento (Ano 1, Ano 2 e Ano 3), contemplando o período chuvoso e seco do ano correspondente da região norte do Espírito Santo e sul da Bahia, sendo construída por meio de matriz de correlação dos dados (LEGENDRE e LEGENDRE, 1994), para isto empregou-se o programa R (R CORE TEAM, 2021), usando os pacotes “ggplots” (WICKHAM, 2016), *FactoMineR* (LE et al., 2008), *factoextra* (KASSAMBARA e MUNDT, 2017) e *factoInvestigate* (THULEAU E HUSSON, 2020). A exceção foi amostragem do Ano 2 que contemplou apenas o período chuvoso, devido à pandemia e, para *Talipariti pernambucense*, foi construída apenas uma PCA considerando todos os períodos amostrais, uma vez que a espécie é amostrada apenas na foz do Rio Doce.

Considerou-se como nível de significância estatística o α igual a 0,05 para todos os testes.

1.6 DIAGNÓSTICO SOBRE A FAUNA DO MANGUEZAL, COMPARTIMENTO CARANGUEJOS

1.6.1 Desenho amostral

Em cada área de estudo parcelas fixas, denominadas estações de coleta, com aproximadamente 75 m² foram delimitadas ao longo do gradiente estuarino: estuário inferior (Setor 1), médio (Setor 2) e superior (Setor 3). Em cada setor, as estações foram demarcadas próximo às margens direita e esquerda dos canais mais representativos do estuário. As estações foram marcadas nos seus extremos com lacres plásticos numerados, georreferenciadas utilizando o GPS Trimble Juno SA e fotografadas (etapa metodológica descrita no item Cartografia). O número de estações variou em função dos estuários e das espécies, *U. cordatus* e *C. guanhumi*. Esta variabilidade no número de estações amostradas em relação ao número de planejadas, propostas no Termo de Referência, foi justificada pelo fato do ecossistema manguezal nos estuários do rio Riacho (Barra do Riacho) e Ipiranga (Urussuquara) apresentarem extensão estreita na zona intertidal, não sendo possível o estabelecimento das parcelas fixas em bosques de bacia. A diferença no número de estações entre as espécies justifica-se pela condição natural de distribuição de *C. guanhumi* na faixa supratidal e pelo fato desta estar ameaçada de extinção por perda de habitat e sobreexploração, dificultando a demarcação de estações amostrais nos estuários monitorados no norte do Espírito Santo. Além da sua baixa densidade populacional, a dificuldade de encontrar áreas com habitat propício que sejam contínuas e extensas também limitou o desenho amostral. Isso se deve ao habitat naturalmente fragmentado, agravado pela supressão de vegetação, bem como ao fato da faixa de planície sujeita à inundação pelas marés de sizígia mais extremas necessária para o recrutamento da espécie ser relativamente estreita.

Em cada estação, pelo menos 3 quadrados de 5 x 5 metros foram demarcados, dentro dos quais as seguintes atividades foram realizadas: contagem das galerias diferenciando-as em abertas, fechadas (indicativo de ecdise) e vazias, identificadas pela ausência de atividades biogênicas (marcas de rastros, detritos ou movimentação de substrato), para estimativa da densidade de indivíduos (indivíduos/m²); e medição do diâmetro (menor e maior) da abertura de cada galeria, uma vez que estas são elípticas, para auxiliar na avaliação da estrutura populacional. As medições dos diâmetros das galerias foram realizadas com o auxílio de paquímetro de aço (marca Digimess), com precisão de aproximadamente 0,03 mm, adaptado pela soldagem de prolongamentos em forma de espátula de 10,5 cm de comprimento, 2 cm de largura e 3 a 4 mm de espessura, com base no método descrito por Schmidt et al. (2008). A contagem das galerias permitiu a estimativa da densidade populacional uma vez que cada galeria, aberta ou fechada, é habitada por um indivíduo (SCHMIDT, 2006).

Armadilhas do tipo ratoeiras foram posicionadas na entrada das galerias para a captura de *C. guanhumi*. Os espécimes coletados tiveram o sexo identificado por dimorfismo sexual externo (formato do abdômen) (MELO, 1996) e o comprimento e largura do cefalotórax foram medidos com paquímetro

digital (sem adaptação) da marca Digimess, com precisão de aproximadamente 0,03 mm, posicionado sobre a superfície dorsal da carapaça. Os indivíduos foram liberados no próprio local de captura logo após as medições.

As amostragens foram bimestrais estendendo-se de outubro de 2018 a setembro de 2019 e a partir de outubro de 2019 passaram a ser trimestrais. As amostragens de *C. guanhumi* no Espírito Santo começaram efetivamente em novembro de 2018, pois no primeiro campo (Campo 1) a equipe dedicou-se a conhecer as áreas de ocorrência da espécie, uma vez que não há qualquer estudo relacionado a esta espécie no norte do Espírito Santo, sendo a sua escala espacial de distribuição no ecótono manguezal/restinga desconhecida.

Fêmeas ovígeras de *U. cordatus* foram coletadas nos estuários Piraquê-Açu (Aracruz), Piraquê-Mirim (Aracruz), Ipiranga (Urussuquara, Linhares), Mariricu (Barra Nova, São Mateus), São Mateus (Conceição da Barra) e Caravelas para estimar a fecundidade, enquanto fêmeas de *C. guanhumi* foram coletadas apenas na foz do Rio Doce por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção. Tais fêmeas foram transportadas em sacos de estopa até o laboratório de Ecologia do Ecossistema Manguezal, localizado na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus São Mateus, para posteriores análises e tombamento das espécies no acervo do projeto. A ausência da coleta de fêmeas ovígeras em alguns estuários é devido a dificuldade da captura dos indivíduos pelos catadores locais, contratados pelo Anexo. Os mesmos relataram dificuldades para a coleta, pois as galerias são profundas e construídas no entorno das raízes de mangue dificultando o acesso pela técnica de braceamento, além disso, fixadas a estas raízes muitas vezes há presença de ostras limitando ainda mais a captura. Em 2020, as áreas não amostradas foram em decorrência do início da pandemia Covid-19.

1.6.2 Procedimentos em laboratório

As fêmeas ovígeras foram lavadas para retirar o excesso de sedimento e, em seguida, as medições biométricas (comprimento e largura do cefalotórax) foram realizadas. O peso do indivíduo com seus ovos foi obtido em balança de alta precisão (modelo AL500C da marca Marte) com precisão de 0,001 g. Após este processo, as fêmeas foram preservadas em solução diluída contendo 90% de água destilada e 10% de formaldeído. Posteriormente, a raspagem da massa ovígera presa nos pleópodes foi realizada e as seguintes informações foram obtidas: (1) peso total (g); (2) peso da subamostra em gramas (g) obtidos a partir de balança de alta precisão; e (3) contagem de ovos, por unidade, da massa ovígera de cada fêmea. Para estimar o número de ovos por fêmea, adotou-se o seguinte procedimento: para cada indivíduo uma subamostra de 2,5 g/ml de massa ovígera foi retirada. Esse volume foi determinado por meio do preenchimento total de um *ependorf* com essa massa. Após este procedimento, o material foi colocado em placa de Petri, pesado e separado com o auxílio de duas pinças para a total separação dos ovos presos aos filamentos.

A separação e a análise do número de ovos por massa ovígera foram feitas utilizando-se o estereoscópio óptico (marca Nikon, modelo Leica M80). Após a separação, a massa foi fotografada

com câmera digital (modelo LEICA EZ câmera 2.6.0). A escala das fotografias foi determinada pelo programa de aquisição de imagens LAS EZ 3.0.0, instalado em computador acoplado ao estereoscópico. O ajuste da escala foi realizado de acordo com o aumento empregado pela objetiva selecionada para a visualização da imagem no estereoscópico. Para cada fêmea analisada, uma alíquota de 2,5 g ml⁻¹ de massa ovígera foi retirada e fotografada. As imagens digitais adquiridas foram transferidas para o programa Paint (Microsoft®) para facilitar a contagem dos ovos da amostra. Posteriormente, o número de ovos foi extrapolado para determinar o número total por fêmea, de acordo com o volume total de ovos avaliados por indivíduo. Todos os exemplares foram devidamente etiquetados com as seguintes informações: espécie coletada; local de captura; data da coleta; tipo de maré; fase lunar; e nome do catador responsável pela coleta. Os exemplares foram armazenados em frascos e conservados no freezer (marca Electrolux, modelo H500) até o posterior tombamento no acervo do projeto.

1.6.3 Análises estatísticas

Densidade populacional, largura de cefalotórax e variáveis ambientais

Os valores de densidade populacional em cada unidade amostra ($n = 3$) foram obtidos considerando-se as contagens de galerias habitadas (tapadas e abertas) registradas. O menor diâmetro das galerias foi empregado para estimar o tamanho dos indivíduos de *U. cordatus*, uma vez que este possui melhor correlação com o comprimento do cefalotórax do caranguejo devido ao hábito da espécie entrar de lado na galeria (SCHMIDT et al., 2008a). A estimativa foi obtida pela conversão do valor do menor diâmetro da galeria em comprimento de cefalotórax (Equação 1) e, posteriormente, em largura (Equação 2), por meio das equações lineares propostas por Schmidt et al. (2008a), sendo elas:

Abertura da galeria

$$\text{Diâmetro menor} = 0,36 + 1,04 \cdot CC \text{ (Equação 1)}$$

Comprimento do cefalotórax

$$LC = -0,05 + 1,30 \cdot CC \text{ (Equação 2)}$$

Onde, CC (mm) corresponde ao comprimento e LC (mm), a largura do cefalotórax, ambos em unidade de milímetros.

A normalidade dos resíduos foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi testada através do teste de Bartlett. Os dados foram transformados ($\log + 1$) quando não apresentaram distribuição normal ou variâncias homogêneas. A ANOVA unifatorial foi aplicada para verificar diferenças entre a densidade populacional de *U. cordatus* entre os estuários em cada período (chuvoso 2018/2019, seco 2019, chuvoso 2019/2020, chuvoso 2021 e seco 2021) e entre os períodos em cada estuário. Para comparar a densidade entre os tipos de bosques (*Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*) utilizou-se o teste T, quando os dados apresentaram distribuição normal e

variância homogênea, quando não atenderam as essas premissas, o teste de Mann-Whitney foi executado. O período chuvoso do primeiro ano de monitoramento correspondeu aos meses entre outubro de 2018 a março de 2019, o período seco aos meses entre abril e setembro de 2019, chuvoso 2019/2020, aos meses entre outubro de 2019 a março de 2020, chuvoso 2021, janeiro a março de 2021 e seco, abril a setembro de 2021. Não houve coleta de dados no período seco 2020 em função da pandemia Covid-19. As mesmas análises foram aplicadas para a variável dependente largura do cefalotórax (mm). Quando os dados não apresentaram distribuição normal mesmo após a transformação, o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o *pós hoc* de Comparações Múltiplas de Dunn foram utilizados. As referências utilizadas nestas análises foram Gotelli e Ellison (2013) e Zar (2010).

Para *C. guanhumi*, ANOVA unifatorial foi aplicada para avaliar a diferença da densidade de indivíduos entre os períodos em cada estuário. A análise de normalidade dos resíduos também foi realizada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram transformados ($\log + 1$) quando não atenderam as premissas para aplicar ANOVA paramétrica (Teste F), e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Após a transformação, utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de Dunn ao não atenderem novamente as premissas.

Histogramas da distribuição de frequência nas classes de tamanho (mm) para *U. cordatus*, por período chuvoso e seco, foram elaborados a partir das estimativas do tamanho dos indivíduos ocupando cada galeria para cada estuário. Para *C. guanhumi*, os histogramas foram elaborados com base nos valores de largura do cefalotórax dos indivíduos capturados e medidos em campo.

Para a realização das análises multivariadas de componentes principais (PCA = *Principal Component Analysis*), utilizou-se o procedimento segundo Gotelli e Ellison (2013) com representação gráfica *biplot* (HOTELLING, 1933; CRUZ e CARNEIRO, 2006). A PCA foi empregada para cada período (chuvoso e seco) considerando os parâmetros populacionais (densidade e largura do cefalotórax), granulometria (frações areia e lama em %), teor de matéria orgânica (%) e carbonato de cálcio CaCO_3 (%) no sedimento, concentração de metais no sedimento (Alumínio, Cromo, Cobre, Ferro, Manganês, Chumbo, e Zinco em mg/kg) e micronutrientes foliar (Alumínio, Cobre, Ferro, Manganês, Chumbo e Zinco em mg/kg). Os valores de cada variável foram inicialmente padronizados pela equação $Z = (Y_i - \bar{Y})/s$ em que Z representa o valor padronizado adimensional, Y_i corresponde ao valor da amostra i para a variável original Y, e \bar{Y} e s representam sua média e desvio padrão respectivamente. A Distância Euclidiana foi usada como medida de dissimilaridade. A representação da variabilidade foi feita em gráfico bidimensional com base nos dois primeiros componentes principais. Análise de correlação de Pearson também foi realizada entre os parâmetros populacionais e concentração de metais no sedimento e micronutrientes foliar. Esta e as demais análises foram realizadas usando o programa R (R CORE TEAM, 2021).

1.6.4 Fecundidade

A fecundidade foi estimada por meio da expressão proposta por Ogawa e Rocha (1976) descrita abaixo:

$$F = N \cdot (P/PS) \text{ (Equação 3)}$$

onde: F = fecundidade individual; N = número de ovos da subamostra; P = peso total da massa de ovos (g); e PS = peso da subamostra (g).

A análise de covariância (ANCOVA) foi realizada para comparar a fecundidade entre os estuários e entre os anos. A homogeneidade das variâncias foi testada por meio do teste de Levene e o teste de Shapiro-Wilk foi conduzido para avaliar a distribuição dos resíduos (ZAR, 2010). Os resultados de F e LC médio das fêmeas ovígeras do estuário do rio São Mateus, no presente monitoramento, foram comparados com aqueles encontrados por Porto et al. (2021), em 2015 e 2016, pela análise de covariância (ANCOVA).

1.6.5 Diversidade

Concomitante com os campos realizados na APA Costa das Algas, captura de crustáceos foram realizadas a fim de obter a diversidade de caranguejos presentes no local. Os crustáceos foram coletados manualmente da superfície ou por revolvimento da toca durante 20 minutos em área aproximada de 200 m² próximo as estações de coleta de dados de *U. cordatus*. Esta metodologia de coleta, chamada de CPUE (*Catch Per Unit Effort*), apresenta menos erros se comparado a apenas a contagem de tocas ou de indivíduos na superfície (MASUNARI, 2006; ARAÚJO et al., 2014). Os indivíduos coletados foram armazenados em sacos plásticos etiquetados, posteriormente crioanestesiados e levados a laboratório para identificação utilizando chaves específicas (MELO, 1996; BEZERRA, 2006). Em seguida, foram fixados e armazenados em álcool 70%. Para as análises de biodiversidade foram calculados os Índices de Shannon-Weaver (H'), Equitabilidade de Pielou (J'), Dominância de Simpson ($1-D$), bem como a abundância total (AT), abundância relativa (AR), frequência relativa (FR).

2 REFERÊNCIAS

- ARAR, E. J. **Method 447.0 - Determination of Chlorophylls a and b and Identification of Other Pigments of Interest in Marine and Freshwater Algae Using High Performance Liquid Chromatography with Visible Wavelength Detection**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1997.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1–15, 1949.
- BLANCHARD, R.W.; REHM, G.; CALDWELL, A.C. Sulfur in plant material by digestion with nitric and perchloric acid. **Proceedings Soil Science Society of America**, v.29. p. 71-72, 1965.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista do Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.
- BREMNER, J. M. Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in the series Agronomy. **American Society of Agronomy**, Inc., Publisher USA, p.1149-1178, 1965.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, v.2, 2006.
- DE MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. Editora Plêiade; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 1996.
- DIAS, J. A. Análise textural. In: DIAS, J. A. **A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos**. Ed. preliminar. Algarve, 2004.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 225 p. 2011.
- FALQUETO, A.R.; SILVA, D.M.; FONTES, R.V. Photosynthetic performance of mangroves *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under field conditions. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, 577-582, 2008.
- GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **A primer of Ecological Statistics**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates. 579 p. 2013.
- GROSS, M. G. Carbon determination. In: CARVER, R. E. (ed.) **Procedure in sedimentary petrology**. New York: Wiley-Interscience. Cap.25, p.573-596, 1971.
- HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of educational psychology**, v. 24, n. 6, p. 417, 1933.
- KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. **R package version**, v. 1, n. 5, p. 337-354, 2017.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Elsevier, Amsterdam, 1994.

LE, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25 n. 1, p. 1-18, 2008.

NÓBREGA, N.E.F., SILVA, J.G.F., RAMOS, H.E.A., PAGUNG, A.F.S. Balanço Hídrico Climatológico e Classificação Climática de Thornthwaite e Köppen para o Município de São Mateus – ES. In: Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem, 18., 2018, São Mateus. **O Equilíbrio do fluxo hídrico para a agricultura irrigada sustentável: anais**. São Mateus: ABID, 2008. Disponível em: <<https://biblioteca.incapex.gov.br/digital/bitstream/item/248/1/1569-sao-mateus.pdf>>.

OGAWA, E. F.; ROCHA, C. A. S. **Sobre a fecundidade de crustáceos decápodos marinhos do Estado do Ceará, Brasil**. 1976.

R CORE TEAM. **R: A Language and an Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: Ago. 2021.

R CORE TEAM. **R: a Language and an Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2019. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 Jun. 2021.

SCHMIDT, A. J. **Estudo da dinâmica populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea-Decapoda-Brachyura), e dos efeitos de uma mortalidade em massa desta espécie em manguezais do Sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SCHMIDT, A. J.; OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, E. P.; MAY, M.; BRITO, S. M. Relação entre abertura de galeria e comprimento de cefalotórax do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea-Decapoda-Brachyura). **Bol. Téc. Cient. CEPENE, Tamandaré**, v. 16, n. 1, p. 56-58, 2008.

SMIT, M.F.; VAN HEERDEN, P.D.R.; PIENAAR, J.J.; WEISSFLOG, L.; STRASSER, R.J.; KRÜGER, G.H.J. Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, 623-634, 2009.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 104, n. 1–2, jul–ago, 2011.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL M.; SRIVASTAVA A. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. – In: Papageorgiou GC, Govindjee (ed.): **Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration**. Springer, Dordrecht, pp 321-362, 2004.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. São Paulo: Edgard Blücher, EDUSP, 318 p. 1973.

THULEAU, S.; HUSSON, F. **FactoInvestigate: Automatic Description of Factorial Analysis**. R package version 1.7, 2020. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=FactoInvestigate>>.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, soils and Oils**. (Technical Resource Document, EPA SW-846/3052), 2013.

WELLBURN, A.R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307-313, 1994.

WENTWORTH, C. K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **Journal of Geology**, 30, 377-392, 1922.

WICKHAM, H. **Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag, New York, 2016.

WOLF, B. Improvements in the azomethine-H method for determination of boron. Comm. **Soil Sci. Plant Anal.**, v. 5, p. 39-44, 1974.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, 3 ed., University of Michigan, 662 pp., 1996

ZAR JH. **Biostatistical analysis**. 5th Ed. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, N. Jersey, 944 p. 2010.