

TERMO DE REFERÊNCIA 4

PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA

ANEXO 3 – ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL NO RIO DOCE, ÁREA ESTUARINA E MARINHA (ÁREA AMBIENTAL 1)

1. CONTEXTO:

Este Termo de Referência trata da implementação de um programa de monitoramento na Área Ambiental 1 com coleta e análise de parâmetros sedimentológicos e geoquímicos (Granulometria, Mineralogia, Metais, Isótopos, Nutrientes e Orgânicos) em associação com parâmetros biológicos (composição, estrutura e dinâmica das comunidades planctônicas a partir de coletas periódicas). Este programa de monitoramento deverá ser implementado para controlar os índices de contaminação/poluição de metais para os ambientes afetados e para entender variações inter-anuais e o comportamento da pluma fluvial. Este monitoramento deverá ser realizado em paralelo com a instalação de um sistema de boias e linhas de fundeio na plataforma e na foz do rio para determinação da vazão e descarga sólida, distribuídas quanto a profundidade e distância da foz para que sejam medidos parâmetros de forçantes oceanográficas (correntes, ondas e estrutura da coluna de água), material particulado em suspensão, química de material dissolvido, tamanho do material particulado em suspensão, temperatura e salinidade da água, fluorescência, etc. O objetivo desta ação é investigar/medir o padrão de dispersão da pluma do Rio Doce inicialmente por um período mínimo de 5 anos, possibilitando assim uma amostragem contínua e que represente diversos cenários meteo-oceanográficos. Deverá ser também instalada uma estação meteorológica na foz do Rio Doce e um marégrafo e de uma estação hidrossedimentológica para monitoramento da vazão e descarga de sólidos. O monitoramento e estudo da dinâmica da pluma devem ser acompanhados da validação e calibração de imagens de satélite visando uma análise espacial da distribuição geográfica da pluma e de parâmetros como MPS, clorofila e temperatura.

O desastre com o rompimento da barragem do Fundão ocasionou impactos nos mais variados graus e intensidades em diferentes ecossistemas de toda a bacia do Rio Doce e um programa de monitoramento destes impactos acompanhado da proposição de medidas de mitigação e recuperação destes ecossistemas demanda, para aumentar as chances de sucesso, a implantação de um programa de estudos de longa duração (veja por ex. Barbosa & Padisák, 2004). Estes autores chamam atenção “que tais estudos são essenciais para interpretar variações biológicas em sistemas onde flutuações irregulares e variações cíclicas são comuns. Além disso, e segundo Keskitalo & Salonen (1998), em várias situações somente estudos de longa duração e séries longas de dados permitem

separar efeitos biogeoquímicos e antropogênicos que operam na bacia de drenagem de efeitos climáticos que operam em escalas regionais ou global”.

Para um embasamento teórico-metodológico para implementação de um programa de estudos de longa duração que permitirão uma avaliação criteriosa dos reais impactos do desastre de Mariana e a proposta de ações mitigadoras e de recuperação é essencial uma avaliação de critérios e definição de protocolos mínimos, seleção de variáveis, análise e consistência de dados, programa de amostragens, como apresentado em Barbosa & Padisák (2004) e Martinelli & Krusche (2004).

2. ÁREA DE ESTUDO:

Nos trechos alto e médio da bacia do Rio Doce deverá contemplar locais afetados e não afetados, representados pelo menos, pelos 26 pontos especificados na Figura 1. Na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente, um primeiro conjunto de estações de amostragem deverá contemplar 33 pontos de coleta de amostras (Figura 2; Tabela 1): Região de Abrolhos (5 pontos de amostragem), Itaúnas – Conceição da Barra/ES (2 pontos de amostragem), Barra Nova - São Mateus/ES (2 pontos de amostragem), Degredo – Linhares/ES (2 pontos de amostragem), Foz do Rio Doce – Linhares/ES (11 pontos de amostragem), Lagoas atingidas na bacia do Rio Doce (8 pontos de amostragem), APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz – Aracruz/ES (15 pontos de amostragem), Vitória/ES (2 pontos de amostragem) e APA de Setiba - Guarapari/ES (2 pontos de amostragem). O objetivo principal das coletas no primeiro conjunto de estações será o de monitorar os parâmetros físico-químicos, a contaminação por metais e os efeitos biológicos da pluma de sedimentos a partir da foz do rio Doce.

Devido à distribuição de macroalgas, rodolitos e estruturas recifais compreenderem áreas mais amplas do que aquelas propostas na malha amostral descrita e devido à característica dos estudos e amostragem a serem realizadas para esses grupos, será definida uma malha amostral específica para os mesmos, conforme demonstrado na Figura 3 e Tabela 2. Para fins de análise das relações entre estes grupos e o ambiente, nos pontos presentes na tabela 3 marcadas com asterisco serão realizadas amostragens para análise de parâmetros físico-químicos da água e sedimento.

Fundeios

Para caracterização hidrodinâmica da plataforma em questão, deverão ser estabelecidas linhas de fundeio em 5 (cinco) pontos na Plataforma Continental. Os fundeios deverão ser compostos por ADPs (medição de ondas e correntes) e sensores de temperatura, salinidade, fluorescência e turbidez. Esta linha de fundeio deverá

contemplar pelo menos uma medição junto ao fundo e outra próxima a superfície. A proposta aqui descrita prevê pelo menos um ponto a aproximadamente -15m na área conhecida como depocentro de lama (Quaresma *et al.*, 2015), um ponto mais ao Norte a cerca de -20m de profundidade, o terceiro ponto a cerca de -40m, um ponto em frente a desembocadura do sistema do Piraquê-açu - Piraquê-Mirim próximo de -20m, na região da REVIS e um ponto ao norte, na profundidade de 20m adjacente à região de Degredo. A frequência de funcionamento dos equipamentos dependerá da profundidade nas quais os mesmos serão alocados. Os ADPs deverão operar com medições horárias de corrente e a cada duas horas para medição de altura, período e direção de onda (a medição pode ser feita em modelo de bursts, com frequência de 2 a 4 kHz). Os dados de temperatura, salinidade e turbidez deverão ser obtidos a cada hora, em sincronia com os dados de ADP.

Também deverão ser realizadas coletas de água para determinação do MPS para calibração do backscatter dos ADPs mensalmente no primeiro ano e trimestralmente nos anos subsequentes. A utilização do backscatter do ADP para estimar o MPS permitirá avaliar a concentração de material particulado em suspensão de forma contínua.

Os fundeios deverão permanecer em funcionamento por no mínimo 5 (cinco) anos, os dados devem ser enviados em tempo real para uma estação em terra por rádio ou satélite.

Modelagem Numérica

A modelagem numérica é uma ferramenta essencial na identificação e entendimento da dinâmica e essencial no acompanhamento dos impactos, já que é possível avaliar a dinâmica e seus efeitos nas distintas escalas espaciais e temporais. O modelo proposto neste acompanhamento é o ROMS (*Regional Ocean Modeling System*) associado ao módulo biogeoquímico PISCES para avaliar o impacto na porção biológica, geológica e química do ambiente marinho receptor final do rejeito vazado.

A escolha deste modelo parte da análise do que já foi observado na área de estudo. Da mesma maneira, a modelagem numérica deverá contemplar as forçantes principais já observadas, incluindo a vazão do Rio, os ventos e a mesoescala, observada com a presença de uma ressurgência costeira. A modelagem deve ser bioquímica em função das amostragens já realizadas na região terem identificado um *input* significativo de nutrientes que favoreceram o desenvolvimento fitoplanctônico e, assim, a cadeia trófica.

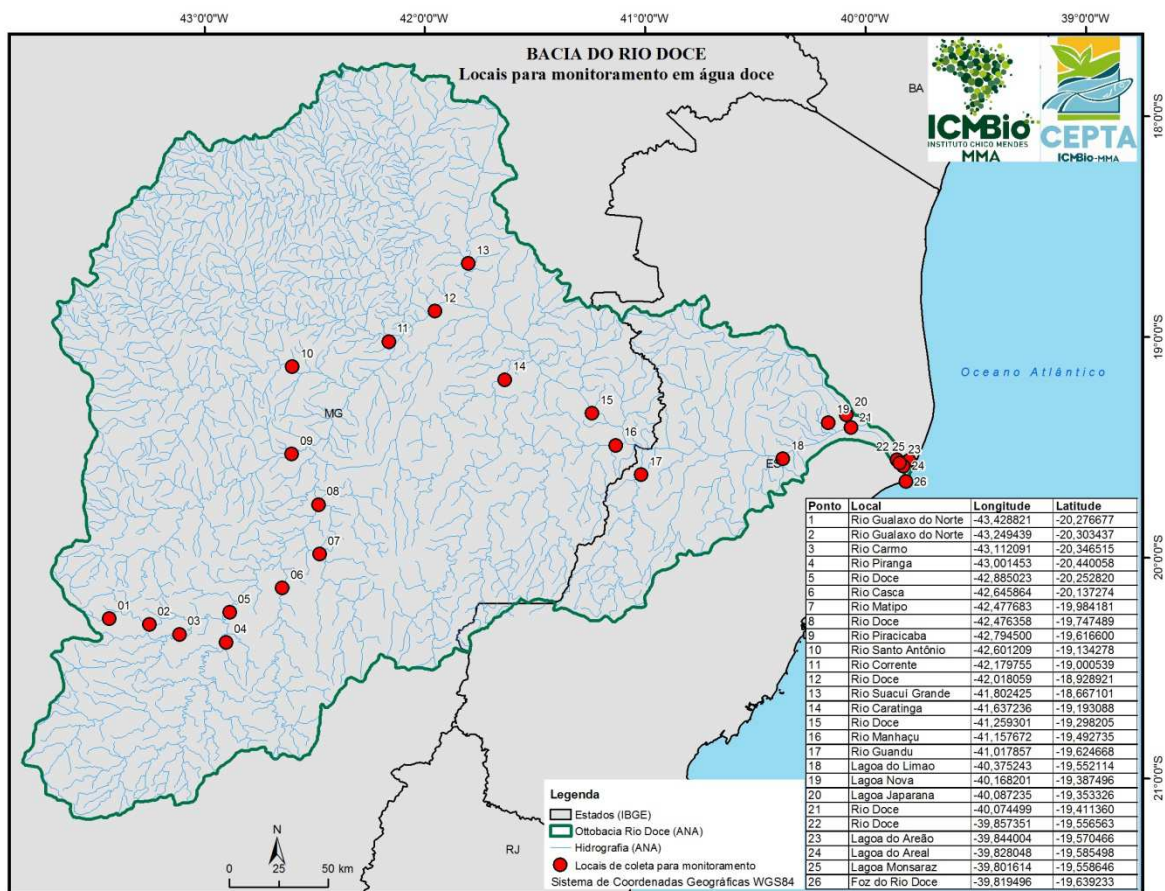


Figura 1. Mapa com os pontos de monitoramento na bacia do Rio Doce.

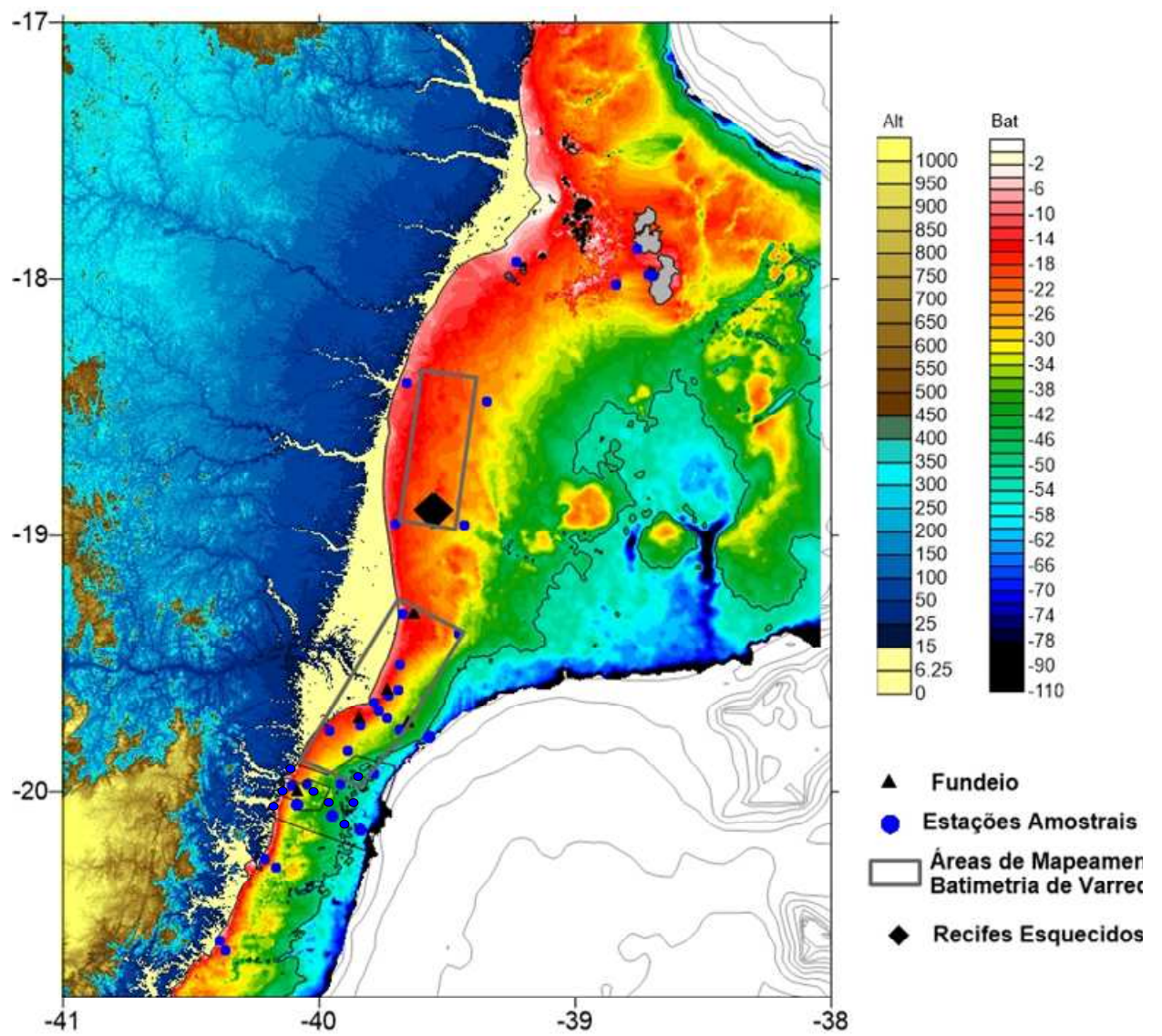


Figura 2. Mapa com os pontos de monitoramento na Foz do Rio Doce e região costeira.



Figura 3: Imagem com os pontos de amostragem específicos para as coletas de macroalgas e rodólitos.

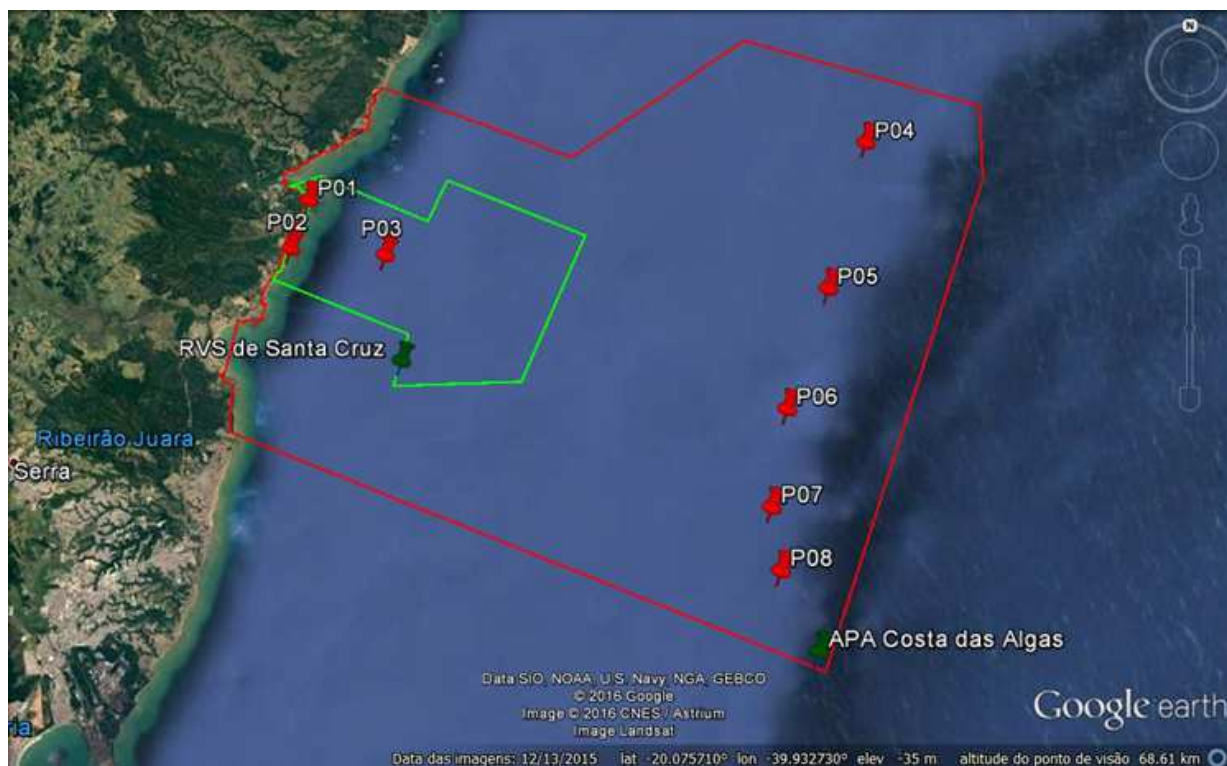


Figura 4: Pontos de amostragem específicos para o estudo de fundos recifais.

Tabela 1. *Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem a serem monitorados na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente (costa do Espírito Santo e sul da Bahia).*

Localidade	Lat	Long
Guarapari	-20,580440	-40,389720
Guarapari	-20,619110	-40,368610
Vitória	-20,262193	-40,212487
Vitória	-20,293670	-40,168049
Costa das algas	-19,977583	-40,108306
Costa das algas	-19,972194	-40,048111
Costa das algas	-19,973833	-39,915306
Costa das algas	-19,932611	-39,782583
Costa das algas	-20,052502	-40,086248
Costa das algas	-20,093839	-39,946339
Costa das algas	-20,151074	-39,844587
Costa das algas	-19,920875	-40,101465
Costa das algas	-20,001464	-40,146739
Costa das algas	-20,037460	-40,173072
Costa das algas	-20,143600	-39,886600
Costa das algas	-20,048200	-39,844700
Costa das algas	-20,008200	-40,034900
Costa das algas	-19,937900	-39,844000
Costa das algas	-20,059200	-39,951800
Foz do Rio Doce	-19,507056	-39,683611
Foz do Rio Doce	-19,605417	-39,689250
Foz do Rio Doce	-19,624583	-39,729278
Foz do Rio Doce	-19,653167	-39,786389
Foz do Rio Doce	-19,686389	-39,769056
Localidade	Lat	Long

Foz do Rio Doce	-19,714556	-39,736972
Foz do Rio Doce	-19,757861	-39,682778
Foz do Rio Doce	-19,840528	-39,886139
Foz do Rio Doce	-19,742333	-39,841028
Foz do Rio Doce	-19,764722	-39,959694
Foz do Rio Doce	-19,823330	-39,593330
Degredo	-19,308584	-39,671964
Degredo	-19,382999	-39,457405
Barra Nova	-18,958668	-39,701499
Barra Nova	-18,961848	-39,434400
Itaúnas	-18,408001	-39,658504
Itaúnas	-18,478489	-39,345227
Abrolhos	-17,991722	-38,697111
Abrolhos	-17,884139	-38,759722
Abrolhos	-17,934861	-39,227222
Abrolhos	-17,981722	-38,715083
Abrolhos	-18,020278	-38,837722
Fundeio Fixo	-20,007985	-40,060810
Fundeio Fixo	-19,715448	-39,847767
Fundeio Fixo	-19,604157	-39,733296
Fundeio Fixo	-19,753605	-39,676061
Fundeio Fixo	-19,305261	-39,637904

Tabela 2. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem específicos para macroalgas e rodolitos.

Localidade	Lat	Long
Costa das algas	-19,900717	-40,091248
Costa das algas*	-19,920875	-40,101465
Costa das algas	-19,930792	-40,116553
Costa das algas	-19,971684	-40,136853
Costa das algas*	-20,001464	-40,146739
Costa das algas	-20,030267	-40,158095
Costa das algas*	-20,037460	-40,173072
Costa das algas	-20,079722	-40,173769
Costa das algas	-19,925940	-39,921821
Costa das algas*	-19,932611	-39,782583
Costa das algas	-20,022589	-39,807999
Costa das algas	-20,094265	-39,834592
Costa das algas*	-20,151074	-39,844587
Costa das algas	-20,186859	-39,839343

Tabela 3. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem específicos para o estudo de fundos recifais.

Localidade	Lat	Long
Costa das algas	-19,971684	-40,136853
Costa das algas	-20,001464	-40,146739
Costa das algas	-20,004891	-40,086895
Costa das algas	-19,932611	-39,782583
Costa das algas	-20,022589	-39,807999
Costa das algas	-20,094265	-39,834592
Costa das algas	-20,151074	-39,844587
Costa das algas	-20,186859	-39,839343

3. METODOLOGIA

3.1. Periodicidade das amostragens

- A malha amostral deverá ser adaptativa e constituída por medições a intervalos mensal, trimestral, semestral, a saber:

i) Mensal: a serem realizadas nas áreas definidas pelos 26 pontos indicados para a bacia e foz do Rio Doce, (Figuras 1 e 2) para caracterização da variabilidade interanual do sistema dulcícula-costeiro-marinho. Nestas estações deverão ser medidos os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), biomassa de plâncton (fito e zooplâncton), perifiton e sedimento de fundo (química e sedimentologia). Deverá ocorrer uma avaliação técnico-científica ao final do primeiro ano com produção de um relatório de análise de dados obtidos.

ii) Trimestral – deverão ser concentradas estações em Vitória, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz, na Foz, em Degredo, em Barra Nova e em Itaúnas (Figura 2). Nessas estações deverão ser medidos os parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), quali-quantitativo de plâncton, macroalgas e rodólitos e sedimento de fundo (bentos, química e sedimentologia). Deverá ocorrer uma avaliação técnico-científica ao final de 3 anos.

iii) Semestral – As medições semestrais deverão ocorrer nos mesmos pontos acima (mensal e trimestral) adicionando-se s estações em Abrolhos e em Guarapari (Figura 2). Nessas estações deverão ser medidos os mesmos parâmetros físicos, químicos (metais, nutrientes), quali-quantitativo de plâncton, e sedimento de fundo (bentos, química e sedimentologia) acrescidos dos parâmetros de ecotoxicidade descritos no Anexo 1 deste Termo de Referência. Deverá ocorrer uma avaliação técnico-científica ao final de 3 anos.

iv) Emergenciais – estrutura para saídas em eventos episódicos importantes, como cheia do rio Doce (pode ser definido pelo controle de cheias ou nível d'água na Bacia), outro desastre e eventos meteorológicos de significância (a ser definido). Parâmetros coletados nos levantamentos mensais com amostragem para posterior análise quali-quantitativa de plâncton e bentos.

v) Medições contínuas: fundeios em 5 (cinco) pontos, sendo 3 (três) na foz, 1 (um) na APA e 1 (um) em Degredo: medições de parâmetros físicos como ondas e correntes, turbidez, temperatura, salinidade e fluorescência ao longo da coluna d'água. Linhas com boias e transmissão online por rádio ou satélite, etc.

- Fundos Rodolitos e Recifais: Instalação de sensores de temperatura e turbidez nos fundos de rodolitos da APA Costa das Algas seguindo os pontos de monitoramento definidos, em composição com placas do tipo CAU para monitoramento e evolução de organismos incrustantes. Fundos recifais deverão ser monitorados semestralmente com imageamento por foto quadrado de parcelas definidas, instalação dos mesmos sensores e de armadilhas de sedimento para serem usadas como traçadores. A área denominada de Recifes Esquecidos (ver mapa Figura 1) deverá ser monitorada seguindo a metodologia apresentada para fundos recifais.

3.2 Parâmetros físico-químicos da água

Em cada estação de monitoramento será realizada perfilagem contínua da coluna d'água com CTD. A coleta de dados *in situ* deverá ser feita de duas formas: coletas de dados de temperatura, salinidade e pressão, além de água em profundidades pré-definidas usando o sistema CTD+Rosette a partir de uma plataforma flutuante em estações previamente definidas. O CTD deverá ser munido de, pelo menos, sensores de turbidez, fluorescência, temperatura da água, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido.

Procedimentos para coleta de água:

A coleta de água ao longo da coluna d'água deverá ser feita com garrafa horizontal e seguir a denominação de superfície (0 a 15cm), meio (metade da profundidade – variável nas estações) e fundo (cerca de 50cm acima do fundo). As análises que devem ser realizadas nestas amostras são: concentração de material particulado em suspensão (MPS – superfície, meio e fundo), geoquímica de metais e orgânicos (superfície e fundo, ver tabela), nutrientes dissolvidos e totais e clorofila-a (superfície e fundo), medições *in situ* com sonda multiparâmetros nas amostras coletadas (OD, pH, STD, Turbidez, Temperatura, Salinidade).

Recipientes para armazenamento das amostras:

Deverão ser utilizados frascos de polietileno (preferencialmente) ou de vidro, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita, com batoque de vedação (apenas frascos de vidro) e tampa de rosca. Deverão ser coletados, em frascos separados:

- 2000 ml de amostras para determinação de metais associados ao material coloidal;
- 1000 ml de amostras para determinação de mercúrio associado ao material coloidal;
- 500 mL de amostra para determinação de metais totais;
- 500 mL para determinação de metais dissolvidos.
- 500 mL para determinação de mercúrio total;
- 500 mL para determinação de mercúrio dissolvido.

As amostras para análise de mercúrio (Hg) devem ser coletadas separadamente.

Limpeza e descontaminação dos recipientes:

- Rinsar 2 vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido nítrico P.A.;
- Lavar 3 vezes com água desmineralizada;
- Rinsar com água milli-Q;
- Deixar secar antes de usar.

Processamento, preservação e conservação das amostras:

Amostras para metais totais:

Deverão ser preservadas pela adição de gotas de solução de ácido nítrico suprapur ou destilado até $\text{pH} < 2$ e, em seguida, deverão ser refrigeradas. Acrescentar 1 ml de ácido nítrico PA (suprapur ou destilado) para cada litro de água coletado. Posteriormente, a refrigeração deverá ser a 4°C e mantida até o momento da análise. A adição de ácido à amostra poderá ser suprimida caso os frascos enviados para coleta já contenham no seu interior o ácido necessário para acidificar a amostra a $\text{pH} < 2$.

Amostras para metais dissolvidos e particulados:

Preservar a amostra apenas refrigerada a 4°C até o momento da análise. NÃO DEVE SER ADICIONADO ÁCIDO NAS AMOSTRAS. Os frascos não deverão ser cheios totalmente. Com este procedimento apenas de refrigeração das amostras, torna-se necessário que as amostras sejam entregues ao laboratório destinado à realização das análises em um período máximo de 24 horas, a partir do momento da coleta.

Amostras de matéria orgânica dissolvida (MOD):

Em cada estação de monitoramento serão coletadas amostras de água da sub-superfície (0,5 m) utilizando-se garrafa de van Dorn (2 L) horizontal para determinação da matéria orgânica dissolvida. As amostras serão filtradas (filtros Millipore 0.22 µm) e mantidas refrigeradas (4°C) e no escuro em frascos âmbar (pré-lavados com água destilada e HCL 10%) até o processamento.

Clorofila-a e Feopigmentos:

Para a determinação de clorofila-a e pigmentos as amostras deverão ser coletadas em 2 frascos escuros de 1 litro totalizando 2 L, previamente rinsados com a amostra, a serem enviados para a filtração o mais rápido possível. Entre a coleta e a filtração, as amostras deverão ser mantidas sob refrigeração (isopor com gelo). Antes da filtração, os frascos deverão ser homogeneizados levemente. As alíquotas para filtração deverão ser medidas com balões volumétricos certificados. As filtrações deverão ser realizadas sob pressão máxima de 200 mmHg, em filtros de fibra de vidro Whatman GF/F 47 mm e em no máximo 15 minutos. As amostras deverão ser filtradas em duplicata para controle de qualidade analítico. A água deverá ser filtrada no momento da coleta. Imediatamente após a filtração, o filtro deverá ser dobrado em dois, levemente pressionado contra papel toalha para tirar o excesso de água, rapidamente colocado em criotubo já identificado e em seguida armazenado em nitrogênio líquido.

Deverão ser registrados para cada amostra: (1) O tempo entre a coleta e a filtração; (2) o tempo de filtração e (3) o tempo total entre o início da filtração e a colocação do filtro no criotubo. Os filtros deverão ser mantidos em nitrogênio líquido até o momento da extração.

Entre as amostras os balões deverão ser rinsados com a próxima amostra (entre amostras da mesma estação) ou lavados com água destilada e posteriormente rinsados

com a amostra a ser filtrada (no caso de filtração sequencial de amostras de estações diferentes). Ao final da filtração os balões deverão ser lavados em água destilada e postos para secar.

Coleta de nutrientes:

Deverá ser realizado através da coleta de 1L de água com garrafa horizontal. A água deve ser armazenada em frascos previamente rinsados e enviada para a filtragem o mais rápido possível e depois congelados.

Caracterização do Material Particulado em Suspensão:

Deverá ser realizado através da coleta de 2L de água armazenadas em frascos que devem ser refrigerados logo após a coleta. Na embarcação, uma sub-amostra deverá ser imediatamente medida para turbidez.

3.3 Procedimentos para coleta de sedimento

A coleta de sedimento de fundo deverá ser realizada com box corer ou busca fundo Van Veen desde que se possa sub-amostrar estratigraficamente os estratos. Para cada análise, uma forma de sub-amostragem se faz necessária e será descrita para cada caso específico.

Uma vez aberta, a amostra deverá ser fotografada e identificada pelo número da estação e datada com marcação da hora de coleta. A análise de ocorrência da lama alaranjada na superfície da amostra deverá ser anotada e, se possível, determinar com uma régua a espessura desta lama de menor densidade. Deverão ser coletadas sub-amostras seguindo a seguinte metodologia:

- Metais – espátula de plástico raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter em torno de 5g e deverá ser armazenada em pote plástico e congelada.
- Orgânicos – espátula de metal raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter em torno de 10g e deverá ser armazenada em pote de alumínio ou vidro (carcinado) e congelada.
- Densidade – amostrar os centímetros superficiais usando um ependorf ou tubo de 5ml de peso conhecido e seguindo o reconhecimento da lama alaranjada. O volume total coletado deve ser conhecido.

- Granulometria e mineral de argila – amostrar a lama alaranjada superficial obtendo cerca de 100gramas de amostra.

- Granulometria total – coleta da amostra total, cerca de 200 gramas.

Testemunho:

Coleta de testemunhos ao longo de uma malha para determinação das taxas de sedimentação através da análise do Pb 210, fluxo geoquímico e análise granulométrica e composicional na coluna estratigráfica. Um total de 20 testemunhos deverão ser coletados na região entre Aracruz e Barra Nova (ES). A testemunhagem deverá ser realizada com testemunhos a gravidade/pistão e sempre em réplica para ter certeza de que haverá material suficiente para todas as análises.

Amostra de Bentos – sedimento inconsolidado:

A coleta das amostras deverá ser realizada em substrato inconsolidado por meio do lançamento de amostradores tradicionais (Box corer, Van veen) apropriados para este ambiente. A amostragem deverá ser realizada em triplicata, garantindo que na primeira réplica seja coletada uma amostra para análise granulométrica. No momento da chegada do amostrador a bordo, as amostras deverão ser fotografadas.

As amostras deverão ser separadas em alíquotas. Uma alíquota de cada réplica deve ser fixada em formol 10% tamponado com bórax. Todas as amostras e alíquotas deverão ser peneiradas utilizando malha de 500 μ m. Quando presente, a água contida no interior do amostrador deverá ser sifonada e filtrada utilizando malha de 45 μ m. A segunda alíquota deverá ser congelada para análise de sequenciamento genético.

Amostras de macrofauna serão peneiradas a bordo em malha de 1mm, e preservadas até triagem e identificação. Animais vivos serão separados a bordo e congelados. A metodologia para análise ecotoxicológica destes organismos está definida no projeto do Anexo 1 deste Termo de Referência.

Fundos de Rodolitos:

No caso de fundo de rodolitos as coletas devem ser realizadas por mergulho autônomo ou arrasto de draga. Um mínimo de 30 nódulos deve ser coletado. Na embarcação, os rodolitos deverão ser devidamente etiquetados e preservados em formaldeído 10%. Fragmentos dos rodolitos deverão ser separados antes da preservação e mantidos em nitrogênio líquido para posterior análise microbiológica.

3.4 Procedimentos para coleta de fitoplâncton, perifiton, zooplâncton, macrófitas aquáticas e ictioplâncton

Ao longo dos 26 pontos da bacia deverão ser colhidas amostras específicas para fitoplâncton, perifiton, zooplâncton e macrófitas aquáticas seguindo as metodologias descritas no item 3.3 do Anexo 2.

Para a foz e região estuarina deverão ser realizados arrastos verticais de zooplâncton com rede tipo WP-2 de fechamento com malha de 200 micrômetros, contendo um fluxômetro mecânico na abertura da boca da rede. Em profundidades superiores a 5 metros e inferiores a 30 metros, deverão ser feitas coletas verticais até metade da profundidade e da metade da profundidade até a superfície para evitar perdas devido à migração dos organismos. Acima de 30 metros as coletas deverão ser feitas do fundo até 30 metros e depois seguindo o padrão anterior. As coletas de zooplâncton deverão ser realizadas no período noturno sempre que possível. O material coletado deverá ser preservado em formalina 4% tamponada com tetraborato de sódio. Cada amostra deverá ser colocada em frasco de polietileno de 500 mL devidamente rotulado. O fixador deve ser colocado antes da amostra. Após colocar a amostra no frasco com fixador, completar o volume até cerca de 400 mL com a água do mar que for utilizada para retirar a amostra do copo da rede.

As amostragens de ictioplâncton deverão ser realizadas na superfície com rede de neuston de 500 micrômetros para coleta de ovos e larvas de peixes. Este material deverá ser preservado em potes plásticos de 500 ml contendo formalina 10% tamponada com tetraborato de sódio. Os arrastos deverão ter duração máxima de 5 (cinco) minutos.

Deverão ser realizados arrastos de ictioplâncton com rede Bongo de 500 micrômetros de malha. Os arrastos deverão ser oblíquos de toda a coluna d'água a uma velocidade máxima de 2 (dois) nós. Este material deverá ser preservado em potes plásticos de 500 ml contendo formalina 10% tamponada com tetraborato de sódio. Após colocar a amostra no frasco com fixador, completar o volume até cerca de 400 mL com

a água do mar que for utilizada para retirar a amostra do copo da rede. Os arrastos deverão ter duração máxima de 5 (cinco) minutos.

As amostras qualitativas de fitoplâncton deverão ser coletadas com o arrasto vertical de rede plâncton de 60 μ m sendo fixadas em formalina.

Armazenamento das amostras:

Armazenar as amostras em local seco.

Acondicionar obrigatoriamente as amostras com fixador dentro do frasco.

Levar para o embarque 2 (dois) jogos de redes de coleta extras como medida de precaução de eventuais perdas ou danos.

Lavar cautelosamente a rede com água doce após cada arrasto, evitando assim contaminação entre as estações de amostragem.

3.5. PROCEDIMENTO DE ANÁLISES

3.5.1 Análise Geoquímica

Os parâmetros a serem coletados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros geoquímicos a serem coletados.

Matriz	Parâmetro geral	Parâmetros específicos
Água	Metais	Totais, Dissolvidos, Particulados, Especiação e Mercúrio.
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis. Matéria orgânica dissolvida
	Elementar (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Enxofre.
	Isótopos (Particulado)	Carbono, Nitrogênio e Compostos orgânicos específicos.
	Nutrientes	Fósforo total, Fósforo dissolvido, Orto-fosfato, Nitrito, Nitrato, Nitrogênio Amoniacal, Silício e N/P Total.
	Parâmetros Físico- químicos	pH, ORP, Salinidade, Temperatura, Alcalinidade, Sólidos totais dissolvidos, DBO e DQO, Condutividade elétrica, turbidez, sólidos em suspensão, sólidos totais, sólidos sedimentáveis.
	Biológicos/Balneabilidade	Coliformes Totais, Coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> .
Sedimento	Metais	Sequencial (frações + total), Terras Raras e Mercúrio.
	Orgânicos	Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos, Biomarcadores lipídicos, Ácidos graxos, Pesticidas, Contaminantes Emergentes, PCB, TBT e Fenóis.
	Elementar	Carbono, Nitrogênio, Arsênio e Enxofre.
	Isótopos	Carbono, Nitrogênio, $^{210}\text{Pb}/^{137}\text{Cs}$ e Compostos orgânicos específicos.
	Nutrientes	Especiação de Ortofosfato em Água Intersticial, fósforo total.
	Parâmetros Físico- químicos	ORP, pH.

METODOLOGIA

METAIS

○ Metais em água

Metais totais

Para a extração dos metais totais nas amostras de água deverá ser utilizado o método EPA 3015A, o qual consiste em adicionar 4 ml de HNO₃ destilado (Sub-boiling) + 2ml de HCl em uma alíquota de 45ml da amostra (água), sendo em seguida aquecidas em forno micro-ondas. A quantificação dos elementos analisados será realizada pelo método EPA 6020A e EPA 6010C, os quais empregam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. Mercúrio deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Metais dissolvidos

A amostra deverá ser filtrada em membrana de porosidade 0,45µm, sendo uma alíquota recolhida, acidificada (pH<2) com adição de HNO₃ destilado (Sub-boiling) e armazenada até análise. A amostra acidificada deverá ser neutralizada e passada em colunas contendo resina catiônica (Chelex®) para eliminação de sódio (Na), devido à quantificação ser realizada em ICP-MS. A quantificação dos elementos analisados deverá ser realizada pelo método EPA 6020A e EPA 6010C, os quais empregam técnicas de ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. Mercúrio deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Especiação de metais

A especiação de metais deverá ser diagnosticada através da técnica de difusão por filmes finos em gradientes de concentração (DGT – Diffusive Gradients in Thin Films), a qual se utiliza de um sistema

sequencial com um gel ligante, um gel difusivo e um filtro de acetato de celulose (porosidade de 0,45 μ m). Após o período de imersão, os dispositivos deverão ser lavados com água ultrapura e colocados em sacos plásticos umedecidos para o transporte até o laboratório. Em laboratório deverá ser realizada, após a abertura dos dispositivos DGT, descarte dos filtros e géis difusivos, sendo os géis ligantes inseridos em tubos Falcon para iniciar o procedimento de eluição dos metais. Este processo deverá ser realizado com a adição de HNO₃ destilado (sub-boiling) nos tubos e agitação orbital dos mesmos por um período de 24 horas. Após a agitação, as resinas deverão ser recolhidas e adiciona-se à solução eluída água ultra-pura, sendo as amostras quantificadas pela técnica de ICP-OES.

○ *Metais no material particulado em suspensão*

O material particulado em suspensão (MPS) deverá ser obtido através da filtração de uma alíquota de amostra da água marinha através de membrana filtrante de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μ m. O material retido pela membrana deverá ser caracterizado quanto a sua composição geoquímica através das análises descritas abaixo. O Mercúrio será analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Metais parciais

Na membrana saturada pelo MPS deverá ser adicionado 10ml de HNO₃ destilado (sub-boiling) e aquecidas em forno micro-ondas (EPA 3051A). Após o término do período de digestão ácida, as amostras deverão ser filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

Terras Raras

A decomposição das amostras de MPS para análise de elementos terras raras deverá ser realizada pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (sub-boiling), HNO₃ destilado

(sub-boiling) e H_2O_2 (Merck). Na membrana saturada pelo MPS deverá ser adicionado 10ml desta mistura de reagentes e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras deverão ser filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato deverá ser realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

- *Metais em sedimentos*

Metais totais

A decomposição das amostras de sedimentos para análise de metais totais deverá ser realizada pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (sub-boiling), HNO_3 destilado (sub-boiling) e H_2O_2 (Merck). Em 0,25g de sedimento, previamente liofilizado e macerado, deverá ser adicionado 10ml desta mistura de reagentes e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras deverão ser filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato deverá ser realizada em ICP MS (Método EPA 6020A). O Mercúrio deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Metais parciais

Para análise de metais parciais deverá ser utilizado o método EPA 3051A (Extração parcial). 0,25g de sedimento será liofilizado e macerado (gral e pistilo de ágata), sendo adicionado 10 ml de HNO_3 destilado (sub-boiling) e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras deverão ser filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato deverá ser realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

Extração sequencial de metais

Análise de metais nas diferentes frações presentes nos sedimentos deverá ser realizada através da extração sequencial proposta por Tessier *et al.* (1979). Este método propõe a quantificação de metais em 5 (cinco) frações distintas obtidas pela eluição sequencial de uma mesma amostra sedimentar (Tabela 5). Os metais nos diferentes extratos obtidos deverão ser quantificados em ICP-MS (EPA 6020A). O Mercúrio deverá ser analisado pela técnica de vapor frio associado ao ICP- MS.

Tabela 5 – Método de extração sequencial proposto por Tessier *et. al.* (1979).

Frações	Método de extração	Componentes sedimentares extraídos
F1 - Trocável	1 M MgCl ₂ , pH 7, 1 h	Íons trocáveis
F2 – Adsovida/Carbonática	1 M NaOAc, pH 5 (HOAc), 5 h	Íons adsovidos, carbonatos
F3 - Redusível	0,04 M NH ₂ OH·HCl in 25% (v/v) HOAc, 6 h, 96°C	Óxidos de ferro e manganês
F4 – Sulfídica/Orgânica	30% H ₂ O ₂ , pH 2 (HNO ₃), 5 h at 85°C, extracted with 3,2 M NH ₄ OAc em 20%	Sulfetos/Orgânicos
F5 - Residual	HF – HNO ₃ – H ₂ O ₂	Metais ligados em minerais litogênicos

Terras Raras

A decomposição das amostras de sedimentos para análise metais totais deverá ser realizada pela abertura total proposta no método EPA 3052, utilizando HF destilado (sub-boiling), HNO₃ destilado (sub-boiling) e H₂O₂ (Merck). Na membrana saturada pelo MPS deverá ser adicionado 10ml desta mistura de reagentes e aquecidas em forno micro-ondas. Após o término do período de digestão ácida, as amostras deverão ser filtradas em filtro qualitativo e a quantificação dos elementos presentes no extrato deverá ser realizada em ICP MS (Método EPA 6020A).

MOBILIDADE DE CONTAMINANTES E MODELO DE ATENUAÇÃO

Para determinar o alcance da contaminação e os processos dinâmicos que afetam os contaminantes, a fim de podermos entender melhor a mobilidade e bio-disponibilidade dos contaminantes deverão ser realizados estudos de mobilidade dos contaminantes.

As análises para este tipo de estudo deverão incluir a extração total ou pseudo-total, definida pela EPA (US-EPA, 2007) para o maior número de elementos que for possível (análises multielementares ICP-OES ou ICP-MS), mas incluindo obrigatoriamente ferro, manganês, alumínio, zinco, cobre, níquel, cromo, arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio. Além dos metais, é necessária uma caracterização do ambiente sedimentar, através da medição dos parâmetros físico-químicos: Eh do sedimento (no momento da coleta); pH do sedimento; granulometria (%<63 µm); carbono orgânico total; enxofre total. A partir das concentrações deverão ser construídos mapas de distribuição utilizando os métodos de interpolação mais adequados. A krigagem é muito utilizada. Esta abordagem permitirá identificar como o material particulado está se depositando no estuário e permitirá ainda avaliar de que maneira os processos geoquímicos controlam esta deposição.

As amostras de sedimento deverão sofrer um procedimento para extração da água intersticial, a qual será analisada por ICP-MS para os mesmos metais analisados no sedimento. O método de extração que é utilizado com mais frequência é a centrifugação. Contudo, o procedimento é inviabilizado em coletas feitas no mar, pois o balanço do barco não permite o funcionamento adequado da centrífuga. Assim, nos casos em que esta dificuldade ocorrer, deverão ser utilizados métodos que espremam o sedimento (Bufflap e Allen, 1995).

Deverá ser realizada a correção pelo alumínio (SEF) de Kemp et al. (1976) e o IGeo (Index of geoaccumulation) de Müller (1969), assim como a correção granulométrica (para a fração $<63\mu\text{m}$) amostra a amostra e plotadas na forma de mapas de distribuição. Deverá ser utilizado o modelo de atenuação de Wasserman and Queiroz (2004) baseado no distanciamento das curvas de concentração do mapa de distribuição. As distâncias entre as curvas de concentração deverão ser medidas e a relação distância pela diferença das curvas determinada, sendo plotado o valor da atenuação na coordenada do ponto mediano. Esta metodologia foi também aplicada nos trabalhos de Wasserman and Moutella (2004); Souza and Wasserman (2015a); Ribeiro et al. (2013). Deverá ser aplicado o procedimento de fracionamento geoquímico pelo método BCR (Ure et al., 1993).

Nas amostras com potencial redox negativo, particularmente aquelas em áreas mais protegidas do estuário e nos manguezais da região deverá ser aplicado o método AVS/SEM. Este método consiste no ataque de uma amostra em sistema fechado com ácido clorídrico 6N. O procedimento volatiliza parte do enxofre (ácido-volátil) que é depois trapeada em uma coluna trap de gás de permanganato de potássio. A solução de ácido clorídrico contém os metais simultaneamente extraídos e que poderão ser medidos por absorção atômica, ICP-OES ou ICP-MS. O sulfetos são medidos na solução de permanganato como sulfatos.

MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA

Mensuração de carbono orgânico dissolvido (COD)

As concentrações do COD (mg.L^{-1}) serão determinadas pelo método de oxidação catalítica de alta temperatura, utilizando-se o analisador de carbono (TOC).

A absorção espectrofotométrica (m^{-1}) do CDOM na água, medida também a partir de amostras de água filtradas (filtros Millipore $0,22\ \mu\text{m}$), será determinada com um espectrofotômetro UV/VIS, utilizando-se cubetas de quartzo e tendo a água Milli-Q como referência (branco). Será realizado a varredura do espectro de absorção (250 – 800 nm) de cada amostra realizado em triplicata.

Caracterização da matéria orgânica dissolvida colorida (MODC)

As medidas de absorbância decádicas (A_λ) do CDOM obtidas a partir das leituras no espectrofotômetro serão convertidas no coeficiente de absorção (a_λ) que utiliza a base logarítmica Neperiana (log natural), utilizando a fórmula $a_\lambda (\text{m}^{-1}) = 2,303 A_\lambda / r$. Onde a_λ é a absorbância espectrofotométrica e r é o caminho ótico da cubeta (m). Os

coeficientes serão corrigidos de qualquer ruído subtraindo-se o valor do coeficiente no comprimento de onda 800 nm de todo o espectro de absorbância. O comprimento de onda na faixa de 350 nm será definido como o índice da concentração da matéria orgânica dissolvida colorida ($CDOM_{350}$).

A inclinação espectral da curva de absorção do CDOM (S) será calculada utilizando-se a regressão linear dos coeficientes de absorbância log-transformados nos intervalos 275 – 295nm ($S_{275-295}$). O $SUVA_{254}$, ($L\ mgC^{-1}\ m^{-1}$) será calculado dividindo-se a a_{254} (m^{-1}) pela concentração de COD ($mg\ L^{-1}$). O $E_{250:365}$ será estimado a partir da razão entre os coeficientes de absorção a_{250} e a_{365} . O valor S_r , será calculada através da razão entre a inclinação espectral (S) obtida entre os intervalos 275 nm a 295 nm ($S_{275-295nm}$) e 350 a 400 nm ($S_{350-400nm}$). O índice de fluorescência (FI) será calculado como a razão das intensidades de fluorescência a 470 nm e 520 nm de emissão e 370 nm de excitação.

OUTROS ORGÂNICOS

Todos os compostos orgânicos listados pelas normativas ambientais regidas pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente, do Ministério do Meio Ambiente (Conama/MMA) deverão ser estudados para água e sedimento. Sendo assim, deverá ser avaliada a presença de Hidrocarbonetos, tanto os de origem biogênica quanto antrópica (HC) e Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) a fim de avaliar a entrada de material relacionado à atividade antrópica. Com o objetivo de melhor avaliar a geoquímica sedimentar e se os processos diagenéticos foram modificados em função do aporte do material de rejeito, deverão ser determinados biomarcadores lipídicos tais como: triterpenóides, hopanóides, ácidos graxos, entre outros. A fim de avaliar o aporte de material oriundo de efluentes domésticos e industriais deverão ser determinados esteróis, pesticidas, bifenilaspolicloradas (PCB), tri-butil-estanho (TBT), fenóis e contaminantes emergentes, tais como fármacos e outros. Também deverá ser verificada a presença de amins tanto éter amins graxas, quanto amins aromáticas a fim de serem utilizadas como marcadores moleculares do material oriundo da barragem de rejeito.

- Hidrocarbonetos (Alifáticos, Hidrocarbonetos Totais de Petróleo, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e biomarcadores lipídicos)

As amostras de sedimento recebidas após as campanhas de coleta deverão ser armazenadas em freezer até os procedimentos laboratoriais para a determinação de hidrocarbonetos. Alíquotas de cada amostra recebida deverão ser liofilizadas e posteriormente homogeneizadas por maceração com auxílio de grau e pistilo. As metodologias a serem utilizadas para a extração e determinação de hidrocarbonetos de petróleo, HPA e

biomarcadores deverão ser baseadas nos protocolos EPA 3540c – Soxhlet Extraction (USEPA, 1996), EPA 8270d – Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC/MS) (USEPA, 2007). Aproximadamente 10 g de sedimento liofilizado e 2 g de cobre ativado para a remoção de enxofre molecular deverão ser adicionados em cartuchos de celulose e extraídos em Soxhlet (12 h / 250 mL de diclorometano). A fim de verificar a eficiência de extração deverão ser adicionados às amostras no início da extração, padrões *surrogates* deuterados (5 µg n-C_{20d}, 5 µg n-C_{24d} e 5 µg n-C_{30d} e 100 ng de p-terfenil-d14). Após a obtenção do extrato bruto, este deverá ser reduzido para o volume de aproximadamente 1 mL em evaporador rotatório e reservados para posterior fracionamento. Os processos de *clean up* e fracionamento dos extratos deverão ser realizados em coluna cromatográfica empacotada com 8 g de sílica (ativada a 160 °C /

16 h e desativada com 2 % m/v de água ultrapura tipo milli-Q®) e 1 g de alumina (calcinação a 450 °C / 4 h e desativada com 2 % m/v de ultra pura tipo milli-Q®). A fração dos hidrocarbonetos alifáticos (F1) deverá ser eluída com 50 mL de hexano, a fração rica em hidrocarbonetos aromáticos (F2) eluída com 70 mL da mistura diclorometano: hexano (1:1 v/v), a F3 contendo esteróis e álcoois deverá ser eluída com 50 mL de acetato de etila e por último a fração contendo ácidos carboxílicos (F4) deverá ser eluída com 50 mL de metanol. As frações eluídas deverão ser concentradas em evaporador rotativo e o solvente trocado por hexano ajustado a aproximadamente 1 mL. Em seguida deverão ser adicionados respectivamente na F1 e F2 os padrões internos n-C_{16d} (5 µg / mL) e um mix de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos deuterados (100 ng / mL) para a determinação dos hidrocarbonetos de petróleo e HPA, respectivamente. Alíquotas das frações F1 e F2 deverão ser reunidas e injetadas para a determinação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Para a quantificação de biomarcadores como terpanos, esteróis e ácidos presentes nas frações F3 e F4 deverá ser utilizado o alfa-colestano como padrão interno.

A quantificação e identificação dos compostos deverá ser realizada através de um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890 com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890 acoplado a espectrômetro de massas 5975c, ambos equipados com auto amostradores CTC CombiPal, injetor *Split/splitless* e coluna capilar DB-5MS (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP deverá ser preparada a partir de um mix padrão de alcanos (n-C₈ – C₄₀) na faixa de concentração de 0,5 a 50,0 µg / mL com padronização interna (n-C_{16d} – 10 µg / mL). A determinação quantitativa de

HTP deverá ser feita pela integração da área total dos cromatogramas, englobando toda a fração resolvida e não-resolvida através da determinação da linha de base, descontando-se as áreas dos picos dos padrões. A programação de temperatura deverá ser configurada com a temperatura inicial de 60 °C por 1 min, então 6 °C / min até 300 °C por 30 min. Para as determinações utilizando-se GC-MS, as condições deverão ser as mesmas citadas, com o acréscimo dos parâmetros de temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e quadrupolo: 300 °C; 300 °C, 200 °C e 150 °C, respectivamente. A quantificação dos HPA também deverá ser realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas deverão ser construídas na faixa de concentração de 5 a 1000 ng / mL utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12) na concentração de 100 ng / mL. Os íons utilizados para a quantificação 16

HPA prioritários, assim como dos seus respectivos padrões internos, estão descritos na Tabela 04. Os HPA deverão ser determinados através do monitoramento fullscan (m/z 50-550) e do monitoramento de íons selecionados (SIM), seguindo as seguintes características: temperatura inicial de 40 °C por 2 min, com taxas de aquecimento de 25 °C / min até 100

°C, 5° C / min até 230 °C, 2 °C / min até 270 °C mantidos por 5 min e 5 °C / min até a temperatura final de 300 °C. Para a determinação dos biomarcadores lipídicos deverão ser utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. Os demais compostos identificados deverão ser determinados em função do padrão interno adicionado, devido a inexistência de padrões comerciais referentes às classes a serem avaliadas.

A identificação dos compostos deverá ser feita pela comparação com injeção de soluções contendo padrões autênticos e consulta à biblioteca de espectros de massas NIST do equipamento.

Tabela 06 – Íons de quantificação dos 16 HPA e padrões internos.

Padrão	Íons de Quantificação (m/z)	Padrão Interno	Íons de Quantificação (m/z)
Naftaleno	128	Naftaleno-d8	136
Acenaftileno	152	Acenafteno-d10	162, 164
Acenafteno	152, 154	Acenafteno-d10	162, 164
Fluoreno	165, 166	Acenafteno-d10	162, 164
Fenantreno	178	Fenantreno-d10	188
Antraceno	178	Fenantreno-d10	188
Fluoranteno	202	Fenantreno-d10	188
Pireno	202	Criseno-d12	236, 240
Benzo(a)antraceno	228	Criseno-d12	236, 240
Criseno	228	Criseno-d12	236, 240
Benzo(b)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(k)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(a)pireno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276, 278	Perileno-d12	260, 264
Dibenzo(a,h)antraceno	278, 279	Perileno-d12	260, 264
Benzo(g,h,i)perileno	276, 277	Perileno-d12	260, 264
p-Terfenil-d14	240, 244	Criseno-d12	236, 240

Verificações periódicas referentes a resposta analítica do sistema cromatográfico deverão ser realizadas com injeções dos padrões durante as análises das amostras de sedimento. Nestes ensaios, deverá ser utilizada como critério de aceitação para controle de qualidade, uma variação máxima de 10 % no sinal cromatográfico dos padrões injetados, dentro da curva analítica previamente construída. Controles de branco de extração, vidraria, ensaios de fortificação e recuperação também deverão ser realizados como controle de garantia das análises.

Valores de recuperação obtidos na faixa entre 70 e 120 % serão considerados aceitos como índices de bom desempenho analítico para o método. Cada batelada de extração deverá conter uma prova em branco para avaliação da confiabilidade analítica, representando testes de controle e garantia de qualidade (QA/QC). Ainda como QA/QC, para verificar a precisão e exatidão do método analítico, deverão ser realizadas análises de amostras de sedimento certificado de referência (Standard Reference Material NIST 1941b).

○ *Pesticidas clorados e bifenilaspolicloradas (PCB'S)*

Os sedimentos deverão ser processados conforme método analítico descrito em UNEP (1992). Aproximadamente 100g de sedimento deverão ser secos em um liofilizador, desagregados utilizando almofariz e pistilo de porcelana, homogeneizados e armazenados em frascos de vidro. Durante as análises, aproximadamente 20g de sedimento seco deverão ser adicionados 100µL de uma mistura de padrões subrogados para a determinação de compostos organoclorados (PCB 103 (C-103N) e PCB 198 (C-198N), AccuStandard, USA). Posteriormente, deverão ser extraídos em aparato Soxhlet durante 8 h com 80 mL de n-hexano e diclorometano (1:1) (J. Baker, México). Os extratos deverão ser concentrados a 2 mL e submetidos à purificação por cromatografia de adsorção em coluna de alumina, com eluição de 15mL de uma mistura 30% diclorometano em n-hexano para a obtenção da fração contendo os compostos organoclorados. Os extratos resultantes deverão ser então concentrados a aproximadamente 500 µL.

Os PCBs e pesticidas organoclorados deverão ser identificados e quantificados em um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies 7890A acoplado a espectrômetro de massas e injetor automático, conforme USEPA

8081b e USEPA 8082. A coluna capilar utilizada deverá ter as seguintes características: fase estacionária de 5% fenil-metil-siloxano, 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme. A injeção de 1µL do extrato da amostra deverá ser em modo sem divisão de fluxo (*splitless*). A programação de temperatura do forno deverá ter início em 100°C (1min) com aumento à taxa de 5°C min⁻¹ até 140°C (1min), aumentando a 1,5°C min⁻¹ até 250°C (1min) e 10°C min⁻¹ até 300°C permanecendo isotérmico por 5 min. A temperatura do injetor deverá ser mantida a 300°C.

As amostras de sedimento superficial deverão ser analisadas para Alfa-HCH (BHC), Beta-HCH (BHC), Gama-HCH (BHC), Delta-HCH (BHC), DDT (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), DDE (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), DDD (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-), dieldrin, endrin, Alfa-clordano, Gama-clordano e o somatório de 7 congêneres de PCBs (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) em sua fração total, conforme na Tabela III do Anexo da Resolução CONAMA 454/12. A identificação dos pesticidas clorados e PCBs deverá ser baseada nos tempos de retenção de padrões autênticos.

A quantificação deverá ser realizada contra padrões externos através das curvas analíticas de cada analito e os padrões subrogados PCB103 e PCB198. A recuperação da metodologia deverá ser avaliada utilizando-se

2,4,5,6-tetracloro-m-xileno (TCMX, M-8082-SS-10X, AccuStandard, USA) como padrão interno e o desempenho analítico através da análise de matrizes fortificadas com padrões, replicatas e brancos analíticos.

○ *Éter-aminas e aminas aromáticas*

As amostras de sedimento liofilizado (10 g) fortificados com trifetilamina deverão ser extraídas com diclorometano por sonicação (3 x 15 mL) ou por Soxhlet (250 mL) por 12 horas (metodologia baseada em Alzaga *et al.*, 1999). A fração dissolvida de amostras de água (1000 ml) deverá ser passada por cartuchos Lichrolut EN (200 mg), previamente ativados com 7 mL de MeOH a 1 ml min⁻¹ e, em seguida, 3 ml de água Milli Q a 1 ml min⁻¹. Posteriormente deverão ser submetidas a etapa de secagem sob vácuo durante 15 min, e a eluição realizada com 3 ml de acetona, seguido de 3 ml de acetato de etila utilizando sistema de extração em fase sólida.

A determinação quantitativa das aminas deverá ser realizada por cromatografia em fase gasosa equipado com um espectrômetro de massas e amostrador automático. A Injeção deverá ser realizada no modo splitless, (ativação em 40 s em 280°C) e deverá utilizar Hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno deverá ser programada de 90°C (1 min) a 120°C a 10°C min⁻¹ e, em seguida, a 320°C a 6°C min⁻¹ mantendo a temperatura final durante 15 min. Deverão ser utilizadas as colunas analíticas: DB-5 de 30m, ID 0,25 milímetros e espessura de filme 0,25 mm (J & W Scientific). O GC-MSD deverá ser no modo eV EI operando no modo fullscan (40-550 uma), temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente.

ELEMENTAR

o *Carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e enxofre.*

A caracterização da matéria orgânica deverá ser realizada através de análises sobre a composição de seus elementos majoritários, a predominância isotópica entre eles e as moléculas que formam. As análises da composição elementar (C, N, P, S) nos sedimentos deste estudo deverão ser realizadas após a descarbonatação, através da adição de HCl 1,0 mol L⁻¹ diretamente nas amostras dentro dos frascos de análises. Este procedimento deverá ser então repetido por duas vezes sendo as amostras secas em estufa a 60 °C por 12 h.

A determinação dos teores de carbono orgânico (CO) e nitrogênio total (NT) deverá ser realizada com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando um analisador elementar (Euro Vector EA3000). Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico deverão ser realizados com padrão certificado.

ISÓTOPOS

- Isótopos estáveis (carbono e nitrogênio), $^{210}\text{Pb}/^{137}\text{Cs}$, compostos orgânicos específicos.

Isótopos estáveis: Na avaliação do aporte orgânico para os sedimentos da região costeira, a amostra deverá ser descarbonatada com o uso de HCl 10%, lavada com água ultrapura e centrifugada para a remoção do sobrenadante. O residual deverá ser seco por liofilização e a análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio (sem a remoção do carbono inorgânico) deverá ser realizada por meio de um analisador Elementar com interface de fluxocontínuo, acoplado a espectrômetro de massa com razão isotópica. A razão isotópica de cada amostra deverá ser referenciada contra o material padrão

seguindo a fórmula a seguir:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{org}} \text{ ou } \delta^{15}\text{N}_{\text{Total}}(\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{Amostra}}}{R_{\text{Padrão}}} \right) - 1 \right] \times 10^3$$

Sendo, R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

- Isótopos $^{210}\text{Pb}/^{137}\text{Cs}$ e taxa de sedimentação

A determinação de ^{210}Pb deverá ser realizada a partir da medida da emissão de seus raios gama, da ordem 47 keV. O efeito da auto-absorção, devido a emissões menores de 100 keV deverá ser levado em consideração e para isso, em cada amostra analisada deverá ser realizado um cálculo do fator de auto-absorção, parâmetro este utilizado no cálculo da atividade final do ^{210}Pb . Assim a atividade do ^{210}Pb deverá ser calculada pela equação 1:

$$A_{\text{Pb-210}} = \{(C \times F) - BG\} / (t \times m \times p_y \times \epsilon)$$

em que:

$A_{\text{Pb-210}}$ é a atividade do ^{210}Pb na amostra (Bq.kg^{-1});

C é o número de contagens do ^{210}Pb na amostra;

F é o fator de auto-absorção;

BG é o número de contagens da radiação de fundo na região do ^{210}Pb (47 keV);

t é o tempo de contagem da amostra, em segundos;

m é a massa da amostra, em quilogramas;

p é a probabilidade de emissão da radiação gama proveniente do ^{210}Pb igual a 0,0418;

ϵ é a eficiência do detector.

A atividade de ^{137}Cs por espectrometria gama é obtida por meio da Equação 3:

$$A_{\text{Cs} - 137} = \{(C - BG) / (t \times m \times p_{\gamma} \times \epsilon)\}$$

em que,

$A_{\text{Cs}-137}$ é a atividade do ^{137}Cs na amostra (Bq.kg^{-1});

C é o número de contagens do ^{137}Cs na amostra;

BG é o número de contagens da radiação de fundo na região do ^{137}Cs (661 keV);

t é o tempo de contagem da amostra, em segundos;

m é a massa da amostra, em quilogramas;

p é a probabilidade de emissão da radiação gama proveniente do ^{137}Cs igual a 0,850;

ϵ é a eficiência do detector.

A análise do branco para os radionuclídeos em estudo deverá ser realizada contando-se um pote plástico vazio no mesmo tempo estabelecido para as amostras. Para cada energia será obtido um valor que é considerado como a radiação de fundo ou *background*; este valor deverá ser então, subtraído da contagem da amostra procedendo-se então à determinação da sua atividade.

NUTRIENTES DISSOLVIDOS (SOMENTE EM ÁGUA)

- ***Orto-fosfato, nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal e silício reativo dissolvido.***

As análises de nutrientes dissolvidos deverão ser realizadas pelo meio de análise de fluxo contínuo (“Continuous Flow Analysis” - CFA), com o uso de um Seal Autoanalyzer (AA3), o qual possui métodos certificados pela USEPA.

Silicato: A análise deverá ser realizada pela técnica de Armstrong (1967) que consiste na adição de uma solução acidificada de molibdato de amônio na amostra para produzir o ácido molibdico que é reduzido para ácido molibdoso (composto azul) com a adição de cloreto de estanho II. Para evitar a interferência do fosfato deverá ser adicionado Ácido tartárico. A amostra deverá ser passada por uma célula de 10 mm e a absorbância medida a 660 nm.

Nitrato + Nitrito: deverá ser realizado o procedimento modificado de Armstrong (1967), no qual a amostra atravessa uma coluna redutora de cádmio, sendo o nitrato presente quantitativamente reduzido a nitrito. O reagente sulfanilamida deverá ser introduzido na amostra seguido pelo reagente N-(1-naftil) etilenodiaminadicloridrato, que se associam e formam o azo corante vermelho. O fluxo deverá passar por uma célula de 10mm e a absorbância medida a 520nm.

Nitrito: A análise deverá ser realizada conforme descrito para nitrato + nitrito, com a exceção da coluna de cádmio.

Fosfato: Deverá ser utilizado a modificação do procedimento descrito Bernhardt e Wilhems com o uso de uma solução ácida de molibdato de amônio adicionada a amostra para a produção do ácido fosfomolibdico, assim reduzida para ácido fosfomolibdoso (composto azul) com a adição de sulfato de dihidrazina. O produto da reação deverá ser aquecido a aproximadamente 55 °C para melhorar o desenvolvimento da coloração e o fluxo passado por uma célula de 10 mm e absorbância medida a 820 nm.

Nitrogênio Amoniacal: O método utilizado deverá ser uma modificação do procedimento de Koroleff (1969, 1970).³⁶

nitrogênio amoniacal deverá ser analisado via reação de Berthelot, no qual o ácido hipocloroso e fenol reagem com a amônia em uma solução alcalina para formar o azul de indofenol. A amostra deverá ser passada por uma célula de 10 mm e a absorbância medida a 660 nm.

Alternativamente, os nutrientes dissolvidos poderão ser dosados através do uso de cromatografia iônica, com a vantagem de redução de volume de amostras, tempo de medição e maior número de amostras.

○ *Nitrogênio e fósforo totais.*

Análises de nutrientes totais deverão ser realizadas por prévia digestão com persulfato de potássio de acordo com Valderrama (1981) e analisadas por fluxo contínuo (“Continuous Flow Analysis” - CFA), conforme métodos para nitrato e ortofosfato descritos anteriormente.

○ *Especiação de fósforo (P)*

Com a premissa de verificar o carreamento de compostos fosfatados por toda a bacia hidrográfica do rio Doce pela lama de rejeitos de minério e aportados na plataforma continental, deverão ser realizadas análises de fosfato em diferentes matrizes sedimentares.

O método a ser utilizado é o descrito por Anschutz e Deborde (2016) que consiste em uma extração sequencial para a mensuração de fósforo em água intersticial P-trocável, P-ligado a ferro, P associado a apatita biogênica, P associado a apatita autigênica e carbonato, P associado a apatita detrital e formas inorgânicas e P orgânico.

As etapas de extração estão descritas na Tabela 7 abaixo e cada extrato deverá ser analisado por colorimetria segundo Murphy e Riley (1962):

Tabela 7 – Etapas de extração de fósforo (P).

Fração extraída	Extrator (tempo)	Reação química
P-trocável	NaHCO ₃ + H ₂ O + tolueno 3x24h	Desorção sem atividade bacteriana em água artificial
P-ligada a ferro (III) amorfo	Ascorbato (20 g/L) 24h	Redução de óxidos de ferro (III) amorfo e dissociação do P.
P-ligado a ferro (III) cristalino	ditionitocitrato bicarbonato 4h	Dissociação de óxido de Fe (III) redutível e P associado.
P-ligado a Hidroxiapatita autigênica	NH ₄ Cl (2M) 16h	Dissociação da hidroxiapatita e P associado.
P-ligado a apatita carbonática autigênica	Acetato de Sódio 16h	Dissociação da apática carbonática e P associado.
P-ligado a apatita detrital e carbonato	HCl (1M) 16h	Dissociação ácida de carbonatos e apatita.
P-orgânico	H ₂ SO ₄ (18M) 16h	Dissociação ácida da matéria orgânica.

3.5.2 Clorofila-a e Feopigmentos

A extração deverá seguir a metodologia proposta por Wright e Jeffrey (1997) com modificações.

A extração da clorofila-*a* e de feopigmentos deverá ser realizada em um ambiente escuro ou penumbra. Para a extração dos pigmentos, deverá ser utilizada uma pinça de ponta fina e cada filtro deverá ser acomodado em um tubo Falcon de 15ml encapados por papel alumínio e fita garantindo que não ocorra penetração de luz dentro do tubo. Com auxílio de uma pipeta deverá ser adicionado 10ml de acetona 90% em cada tubo. Depois do procedimento anterior, as amostras deverão ser mixadas por 1 minuto ou até que o filtro esteja dilacerado. Ao final da mixagem os tubos devem ser armazenados em geladeira, ao abrigo da luz, por um período de 24 horas.

Após o período de refrigeração, as amostras deverão ser centrifugadas por 5 minutos. Em seguida a amostra de cada tubo Falcon deve ser transferida para outro tubo Falcon limpo e centrifugadas por mais 5 minutos garantindo que todo o material tenha sido sedimentado e extraído. A leitura no espectrofotômetro deverá ser iniciada imediatamente após a centrifugação das amostras, as quais deverão ser transferidas para

as cubetas e encaixadas no equipamento e realizadas as leituras nos comprimentos de onda de 665nm, 647nm, 630nm e 750nm anotando em uma planilha as absorbâncias de cada comprimento de onda sendo necessário zerar a leitura com acetona 90% a cada mudança de comprimento de onda.

Após a leitura desses comprimentos de onda, em cada cubeta deverá ser acrescentado 2 gotas (0,1ml) de HCl (0,2M) para a conversão de clorofila-a para feopigmentos e realizar novamente as leituras no espectrofotômetro anotando suas respectivas absorbâncias nos comprimentos de onda de 665nm, 647nm, 630nm e 750nm.

3.5.3 Material Particulado em Suspensão

Para determinação da concentração do Material Particulado em Suspensão será utilizado o método gravimétrico com filtragem da água em filtro de fibra de vidro com poro de 0,7 μ m e 47 mm de diâmetro. Os filtros devem ser pesados previamente e seco em estufa a 40°C. Depois de filtrado, o mesmo deve ser seco a estufa em 40°C.

Após esse procedimento os filtros deverão ser colocados em um dessecador para evitar absorção de humidade, e serem, pesados e identificados individualmente.

Deverá ser filtrada uma quantidade conhecida de água, que nesse caso dependerá da concentração. Em áreas com excesso de MPS não há necessidade de filtrar 1 L, mas para áreas de menor concentração a filtragem deve ser no mínimo de 1 L. O filtro deverá ser lavado em água deionizada após a filtragem para retirada de sal.

As amostras deverão ser filtradas, com auxílio de uma bomba a vácuo. Posteriormente, estes filtros contendo o material em suspensão deverão ser secos em estufa por 48 horas a temperatura entre 40°C e 60°C, e novamente pesados. Pela diferença do peso antes e depois da filtragem, deverá ser obtida a concentração de MPS. A unidade da concentração do MPS deverá ser em mg/L. Para determinação do teor de Matéria Orgânica das amostras de MPS os filtros deverão ser incinerados em mufla a 550° por 5 horas.

3.5.4. Sedimento – Granulometria e Composição

O sedimento deverá ser lavado em água doce para retirada de sal e colocado para secar em estufa a 40°C pelo tempo que for necessário para completa retirada de água. Após o sedimento seco, o mesmo deverá ser pesado e peneirado via úmida em peneira

de 63 micrômetros para separação da fração areia. Novamente o procedimento de secagem da fração areia deverá ser repetido, e uma nova pesagem (desta fração) para determinação dos teores de lama e areia. A granulometria da fração areia deverá ser determinada por peneiramento de 0,5 em 0,5 Φ e a fração lama deverá ser levada ao granulômetro a laser após queima de MO por peróxido. No caso da fração lama não há necessidade de novo procedimento de secagem, uma vez que, o granulômetro utiliza amostras úmidas. Os valores dos teores deverão ser determinados a partir da diferença entre o peso total e o peso da fração areia, assim se chegando ao peso da fração lama.

Densidade

A amostra deverá ser coletada em recipiente de volume conhecido e previamente pesado e identificado. Em laboratório esse recipiente deverá ser imediatamente pesado com o sedimento húmido e levado a estufa entre 40°C e 60°C para secagem. Após seco o recipiente deverá ser novamente pesado. O valor da densidade molhada será a razão entre a massa da mistura (peso húmido) e o volume da mistura. O valor da massa seca é necessário para arquivamento em caso de necessidade do conhecimento de teores de água para determinação da densidade seca.

A determinação da mineralogia de argila do MPS deverá ser realizada, através do sedimento fino pulverizado que, em seguida deverá ser injetado em um difratômetro, com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um *counter* de cintilação e um monocromador de grafite. Os padrões de difração deverão ser gravados em modo *step-scan* em passos de 0.02°, a dois segundos por passo. As configurações dos *slits* de divergência, recebimento e espalhamento deverão ser de 0.5°, 0.3 mm e 0.5°, respectivamente. Os padrões de difração deverão ser gravados de 4° a 120°. Análise e determinação da composição isotópica e de terras raras do MPS deverá ser utilizada para a determinação de procedência geológica e de localização.

Testemunhos

Os testemunhos para análise sedimentológica deverão ser abertos em duas metades, fotografados e subamostrados. A subamostragem deverá ser de no máximo a cada 2cm. Alíquotas serão separadas para determinação do teor de carbonato de cálcio (dissolução por HCl a 10%), teor de matéria orgânica (queima em Mufla a 450 °C) e análise granulométrica. A granulometria deverá ser realizada em peneiramento a úmido para separação da fração lama e areia. Posteriormente a fração areia deverá ser peneirada a seco a cada 0,5 Φ e a fração lama deverá ser analisada em granulômetro a

laser. A alíquota remanescente da dissolução de carbonato de cálcio deverá ser usada para separação de minerais pesados por densidade usando bromofórmio.

Pelo menos 10 sub-amostras deverão ser analisadas para mineralogia de argilas e de minerais pesados, igualmente espaçadas ao longo do registro sedimentar. A metodologia para definição dos argilo minerais deverá ser por difratometria de raio-x. O sedimento fino deverá ser pulverizado e, em seguida, injetado em um difratômetro, com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um counter de cintilação e um monocromador de grafite. Os padrões de difração deverão ser gravados em modo step-scan em passos de 0.02°, a dois segundos por passo. As configurações dos slits de divergência, recebimento e espalhamento deverão ser de 0.5°, 0.3 mm e 0.5°, respectivamente. Os padrões de difração deverão ser gravados de 4° a 120°.

A análise geoquímica de metais e orgânicos deverá ser realizada nas alíquotas amostras e definidas, sendo no mínimo 10 subamostras espalhadas ao longo do testemunho de acordo com a metodologia já descrita neste documento.

Análise de Clorofila

A extração a ser realizada deverá seguir a metodologia proposta por Wright e Jeffrey (1997) com modificações.

A extração da clorofila *a* e de feopigmentos deverá ser realizada em um ambiente escuro ou penumbra. Para a extração dos pigmentos, com uma pinça de ponta fina cada filtro deverá ser acomodado em um tubo Falcon de 15 ml encapados por papel alumínio e fita garantindo que não ocorra penetração de luz dentro do tubo. Com auxílio de uma pipeta será adicionado 10 ml de acetona 90% em cada tubo. Depois do procedimento anterior, as amostras deverão ser mixadas por 1 minuto ou até que o filtro esteja dilacerado. Ao final da mixagem os tubos devem ser armazenados em geladeira, ao abrigo da luz, por um período de 24 horas.

Após o período de refrigeração, as amostras deverão ser centrifugadas por 5 minutos. Em seguida a amostra de cada tubo Falcon deve ser transferida para outro tubo Falcon limpo e centrifugadas por mais 5 minutos garantindo que todo o material tenha sido sedimentado e extraído. A leitura no espectrofotômetro deverá ser iniciada imediatamente após a centrifugação das amostras, as quais deverão ser transferidas para as cubetas e encaixadas no equipamento e realizadas as leituras nos comprimentos de onda de 665nm, 647nm, 630nm e 750nm anotando em uma planilha as absorbâncias de cada comprimento de onda. Ressalta-se que é necessário zerar a leitura com acetona

90% a cada mudança de comprimento de onda.

Após a leitura desses comprimentos de onda, em cada cubeta deverá ser acrescentado 2 gotas (0,1ml) de HCl (0,2M) para a conversão de clorofila para feopigmentos e realizar novamente as leituras no espectrofotômetro anotando suas respectivas absorbâncias nos comprimentos de onda de 665nm, 647nm, 630nm e 750nm.

3.5.6 Análise do Plâncton

Fitoplâncton

As amostras qualitativas coletadas em todas as estações de amostragem com arrasto vertical de rede de 20 μ m (para os 26 pontos da bacia) e 60 μ m (para a foz e região estuarina) deverão ser identificadas através de microscópio biológico óptico equipado com câmera digital e utilizando bibliografias especializadas. Cada espécime representante de um taxon deverá ser fotografado, desenhado e medido, sendo dado a ele um código de identificação. Deverão ser utilizadas chaves taxonômicas revisadas e atualizadas e quando não for possível realizar a identificação das amostras a nível de espécie, estas deverão ser genericamente tipadas de acordo com os morfotipos baseados na forma e dimensões ou registradas em seu menor nível taxonômico possível. Deverá ser realizada também uma análise crítica da lista de taxa para confirmar a adequação da ficoflórula ao local em função da metodologia de análise e a revisão da taxonomia e enquadramento taxonômico. Os nomes científicos deverão ser checados em bancos de dados internacionais.

Das amostras quantitativas coletadas na superfície e segunda profundidade, o volume total (1 litro) de cada amostra deverá passar por processos de sedimentação sucessivos, seguido de retiradas do sobrenadante com auxílio de bomba a vácuo, até a redução do volume para 250 mL sem qualquer tipo de filtração, sendo estocado em frasco de polietileno com batoque. Para contagem do fitoplâncton, deverá ser adotado o método de sedimentação proposto por Uthermöhl (1958), através da utilização de câmaras de 50 mL, por um tempo mínimo de sedimentação de 48 horas. Em todos os processos de sedimentação deverá ser utilizado o critério de Sournia (1978), que prevê um tempo mínimo de 4 horas de sedimentação para cada 1 cm de altura da coluna de água.

A contagem dos organismos deverá ser realizada em microscópio invertido com aumento de 400 vezes e com base no procedimento de campos aleatórios descrito por Uehlinger (1964), que serão gerados por programa de computador. A determinação do número de campos a serem contados deverá ser realizada segundo Lund *et al.* (1958) e deverá alcançar 100 indivíduos da espécie mais abundante, permitindo trabalhar com intervalos de confiança de aproximadamente 20% da média, a um nível de significância de 95%, o que é considerado como suficiente para estudos desta natureza. Entretanto deverá ser adotada a contagem mínima de 25 campos para cada amostra, mesmo que a espécie mais abundante já tenha superado o total de 100 indivíduos contados, visando assim obter maior confiabilidade dos dados. Deverão ser contados os indivíduos e também o número de células, no caso de organismos pluricelulares.

A densidade numérica deverá ser expressa em indivíduos.mL⁻¹ e/ou células.mL⁻¹ e calculada segundo a fórmula modificada de Wetzel e Likens (1979). Estes valores também poderão ser expressos em indivíduos.L⁻¹ e/ou células.L⁻¹ dependendo da escala dos resultados.

A partir dos valores de densidade do fitoplâncton deverão ser calculados os índices de diversidade específica (bits.indivíduos-1 e/ou bits.células-1 (SHANNON; WEAVER, 1949) e de equitabilidade (PIELOU 1975 apud LEGENDRE; LEGENDRE, 1983).

Concomitante às contagens deverão ser efetuadas análises morfométricas para a avaliação do biovolume celular. Os espécimes encontrados durante a contagem deverão ter registro fotográfico por meio de câmera digital, acoplada ao microscópio, que darão subsídios ao cálculo da biomassa através das medições de suas dimensões.

Zooplâncton

As amostras deverão ser fracionadas de acordo com a densidade de organismos nas amostras. No caso de amostras de ambiente marinho, para a obtenção de sub-amostras deverá ser utilizado o partidor Folsom Plankton Sample Splitter (Hidrobios®), sendo o número de divisões (1/2, 1/4, 1/8... até 1/1024) realizado de modo a garantir a presença de pelo menos 1.000 espécimes na alíquota. Para os ambientes de água doce sub-amostras deverão ser retiradas com pipeta tipo Stempel até que um mínimo de 200 indivíduos da espécie dominante seja contabilizado. A contagem das sub amostras deverá ser feita em Câmara de Sedgewick-Rafter sob microscópio óptico. Em contraposição, as amostras de pequeno volume deverão ser contadas em sua totalidade.

As subamostras obtidas deverão ser analisadas sob microscópio estereoscópico utilizando câmaras de Bogorov para separação em grandes grupos taxonômicos.

Sequencialmente deverá ser realizada a identificação dos componentes do zooplâncton ao menor nível taxonômico possível, utilizando bibliografia especializada (e.g. BOLTOVSKOY, 1999; BONECKER, 2006; entre outros) e, quando necessário, microscópio óptico Nikon Eclipse 50i deverá ser utilizado para identificação de partes específicas dos organismos para auxiliar nesta identificação. A nomenclatura dos taxa deverá ser checada junto ao banco de dados internacional ITIS – Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.gov>) para verificação da validade do nome.

Ictioplâncton

Os ovos e larvas de peixes deverão ser totalmente triados das amostras coletadas tanto na malha de 500 μm da rede Bongo quanto na neustônica. No caso da quantidade de ovos ser muito grande poderá ser realizado o fracionamento com o Folsom Plankton Sample Splitter (Hydrobios®), mas deverão ser triados até um mínimo de 100 indivíduos. O fracionamento deverá ser realizado apenas para o grupo de ovos que for mais abundante. Em determinadas amostras os ovos elípticos podem ser pouco abundantes e não deverão ser fracionados; enquanto os ovos redondos não ornamentados podem estar presentes em grande número, devendo fracioná-los. O número total de ovos e larvas de peixes coletados com a rede Bongo deverá ser expresso

por 100 m^{-3} (ovos/larvas. 100 m^{-3}) e por 1000 m^2 (ovos/larvas. 1000 m^2) para as amostras da rede neustônica.

Após a identificação os ovos de peixes deverão ser preservados em formol tamponado a 4% e as larvas de peixes preservadas em álcool 70%, com exceção das larvas do grupo leptocephali que deverão ser preservadas em formol tamponado a 4%.

A identificação dos ovos e larvas de peixes deverá ser realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, utilizando alguns parâmetros merísticos e morfométricos. Para auxiliar nessa etapa, deverão ser utilizadas referências bibliográficas especializadas, tais como: Moser *et al.* (1984); Moser (1996); Matsuura e Olivar (1999), Richards (2006); Bonecker e Castro (2006); Fahay (2007); Bonecker *et al.* (2012), entre outros.

A classificação do icteoplâncton deverá ser baseada em Nelson (2006) e todas as espécies identificadas deverão ser checadas no ITIS – Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.gov>) para verificação da validade do nome.

3.5.7 Análise de Dados Físico-Químicos e de Fundeio

Os dados obtidos por CTD deverão ser analisados para gerar perfis de variação dos parâmetros ao longo da profundidade e variação espaço-temporal destas informações. Os dados de fundeio devem ser analisados como séries temporais e interpretados com base na variabilidade dos diversos parâmetros.

3.6. AVALIAÇÃO DOS HABITATS

3.6.1 Registro do impacto e taxas de sedimentação

Deverá ser realizada a coleta de testemunhos ao longo de uma malha amostral para determinação das taxas de sedimentação através da análise do Pb 210, fluxo geoquímico e análise granulométrica e composicional na coluna estratigráfica. Um total de 20 testemunhos deverão ser coletados na região entre Aracruz e Barra Nova (ES). A testemunhagem deverá ser feita por testemunhos a gravidade/pistão e sempre em réplica para ter certeza de que haverá material suficiente para todas as análises.

Os testemunhos para análise sedimentológica deverão ser abertos em duas metades, fotografados e subamostrados. A subamostragem deverá ser de no máximo a cada 2cm. Alíquotas deverão ser separadas para determinação do teor de carbonato de cálcio (dissolução por HCl a 10%) e teor de matéria orgânica (queima em Mufla a 450 °C) e análise granulométrica. A granulometria deverá ser realizada em peneiramento a úmido para separação da fração lama e areia. Posteriormente a fração areia deverá ser peneirada a seco a cada 0,5 phi e a fração lama analisada em granulômetro a laser. A alíquota remanescente da dissolução de carbonato de cálcio deverá ser usada para separação de minerais pesados por densidade usando bromofórmio.

Pelo menos 10 sub-amostras deverão ser analisadas para mineralogia de argilas e de minerais pesados, igualmente espaçadas ao longo do registro sedimentar. A metodologia

para definição dos argilo minerais deverá ser por difratometria de raio-x. O sedimento fino deverá ser pulverizado e, em seguida, injetado em um difratômetro, com um tubo selado de Cu K-alpha (40 kV, 20 mA), um counter de cintilação e um monocromador de grafite. Os padrões de difração deverão ser gravados em modo step- scan em passos de 0.02°, a dois segundos por passo. As configurações dos slits de divergência, recebimento e espalhamento deverão ser de 0.5°, 0.3 mm e 0.5°, respectivamente. Os padrões de difração foram gravados de 4° a 120°.

A análise geoquímica de metais e orgânicos deverá ser realizada nas alíquotas amostras e definidas, devendo ser no mínimo 10 sub-amostras espalhadas ao longo do testemunho de acordo com a metodologia já descrita neste documento. A espessura do depósito deverá ser investigada através de um levantamento geofísico com um perfilador de sub-fundo de alta frequência, usando um sistema de multi-frequência variando de 20 a 0,5 kHz. O perfilador em questão deverá ter alta definição na superfície e permitir o mapeamento dos refletores nos primeiros metros do depósito o que permitirá identificar o refletor relacionado ao desastre e que servirá de controle para levantamentos futuros. O levantamento deverá ser novamente realizado após 3 (três) anos para comparação de espessura do depósito.

3.6.2. Mapeamento dos habitats bentônicos da Plataforma Continental adjacente a foz do Rio Doce

O mapeamento dos habitats bentônicos deverá ser determinado através de amostragens de sedimento superficial e levantamento geofísico. Deverá ser realizado um mapeamento acústico com sonar de varredura lateral e/ou batimetria de multifeixe com backscatter (frequência entre 100 e 600 kHz), para recobrimento da área de enfoque deste trabalho. É necessário que haja no caso do levantamento com sonar de varredura lateral um dado batimétrico para caracterização da profundidade e feições morfológicas. Amostras de sedimento superficial deverão ser utilizadas para calibração do sinal de retorno do sonar e caracterização e estudo da comunidade bentônica. O mapeamento deverá inicialmente ser realizado através de transectos perpendiculares a costa entre a isóbata de 10 e 40m, a cada 2km. A varredura deverá ser ajustada de acordo com a profundidade, não menos do que 100m para cada lado. Este mapeamento inicial será realizados entre as coordenadas 18° 20' S/39° 38' W e 20° 13' 40'' S/40° 11' 6'' W.

Na área em frente a foz do Rio Doce, deverá ser realizado um levantamento de batimetria multifeixe com backscatter (frequência entre 200 e 300kHz) cobrindo toda a área apresentada no mapa da Figura 1. Os vértices do polígono são: -39.69312, -19.24923/-39.43701,-19.37932/-39.83744,-19.98300/-40.07932, -19.86918. A segunda área de mapeamento com batimetria de varredura deverá ser a região de ocorrência de recifes já conhecida (Recifes Esquecidos e a região da APA Costa das Algas). A área a ser mapeada está pontada na Figura 1 e os vértices do polígono são: -39.59970,-18.36134/-39.38643,-18.38708/-39.47100,-18.97357/-39.68427,-18.93864.-ES.

A caracterização do habitat deverá ser realizada por método direto envolvendo o imageamento do fundo e coleta de material. O imageamento do fundo deverá ser feito por transectos de vídeos, em todos os habitats mapeados. Estes transectos deverão ter no mínimo 2km de comprimento e estarem distribuídos para serem representativos dos habitats. A metodologia para realização dos transectos deverá ser feita por veículo autônomo submerso (AUV) equipado com pelo menos duas câmeras de alta resolução (filmando em 4k). As imagens deverão ser georreferenciadas e apresentar informação de escala do fundo e profundidade e rumo. Se justificado, os transectos poderão ser feitos por ROV profissionais ou semi-profissionais, equipados com os mesmos sistemas. Registros videográficos deverão ser selecionados e recortados em 30 quadros estáticos, permitindo estimar a densidade dos principais organismos visualizados e a forma, tamanho, vitalidade e cobertura dos elementos das formações recifais, bancos de rodolitos e fundos lamosos/arenosos, lamosos e cascalhosos. As análises das imagens deverão ser conduzidas em programas como Coral Point Count with Excel Extensions e ImageJ (National Institute of Health, USA). A partir dos dados obtidos deverão ser calculadas a riqueza S, a diversidade α aparente de Shannon-Hill e a diversidade α real de Shannon-Wiener, e a Dominância de Simpson. Para a estimativa das similaridades entre os pontos amostrais em modo Q (elementos amostrais) e em modo R (espécies), deverá ser adotado o índice de similaridade de Kulczynski, usando PRIMER 5.0. As similaridades entre os pontos amostrais quanto à composição faunística associada aos fatores físicos deverão ser analisadas pelo método de ordenação utilizando MDS (Non-metric multidimensional scaling). A análise dos dados acústicos deverá ser integrada com verdades de campo (amostras de fundo) e imageamento do fundo marinho para elaboração de um mapa de habitats.

A coleta de material de fundo para caracterização da comunidade bentônica em fundos lamosos e arenosos, deverão ser realizadas por busca fundo do tipo van veen ou box corer, sempre em triplicata. Em cada estação amostral para bentos na plataforma interna deverão ser quantificadas a estrutura da meiofauna (45 μ m-300 μ m) e macrofauna bentônica (500 μ m-1mm), em cada amostra. Sub-amostras de meiofauna e macro fauna deverão ser congeladas para metasequenciamento genômico seguindo protocolos usuais. Nas mesmas triplicatas deverão ser coletadas sub-amostras em triplicatas, formalizadas

para posterior peneiramento e triagem de material. As análises do material triado deverão considerar um nível taxonômico até Família, no mínimo. A partir dos dados obtidos deverão ser calculadas a riqueza S, a diversidade α aparente de Shannon-Hill e a diversidade α real de Shannon-Wiener, e a Dominância de Simpson. Para a estimativa das similaridades entre os pontos amostrais em modo Q (elementos amostrais) e em modo R (espécies), deverá ser adotado o índice de similaridade de Kulczynski, usando PRIMER 5.0. As similaridades entre os pontos amostrais quanto à composição faunística associada aos fatores físicos deverão ser analisadas pelo método de ordenação utilizando MDS (Non-metric multidimensional scaling).

Nas mesmas amostras deverão ser separadas amostras para testes de toxicidade, seguindo a metodologia definida no Anexo 1 deste Termo de Referência.

3.6.3. Macroalgas, Rodolitos e Fundos de Rodolitos

Macroalgas e rodolitos deverão ser coletadas em pontos amostrais dispostos ao longo da APA Costa das Algas e do RVS de Santa Cruz. Com relação aos rodolitos, além de coletas nas áreas rasas, também serão realizadas coletas e análises nos fundos de rodolitos, presentes na porção profunda da APA Costa das Algas, onde nesta área também deverão se realizados esforços para a coleta de macroalgas.

Com relação às macroalgas, deverão ser realizadas amostragens quantitativas e qualitativas, incluindo rodolitos, identificação e realização de índices ecológicos, como de riqueza, e análise de vitalidade dos rodolitos.

Deverão ser realizados estudo de medição da taxa de sedimentação sobre os fundos de rodolitos e realizar análise da composição do sedimento e isótopos observado no coletor e testemunhador, visando verificar a origem do mesmo.

Amostras biológicas deverão ser obtidas diretamente nos bancos de rodolitos, predominantemente localizados na região da APA Costa das Algas, através de mergulho técnico, draga do tipo retangular e/ou com rede de arrasto de fundo.

Em cada local de amostragem deverão ser coletados ao menos 30 rodolitos, sendo ainda o fundo fotografado para registro da estrutura. Na embarcação, os rodolitos deverão ser devidamente etiquetados e preservados em formaldeído 10%. Fragmentos dos rodolitos deverão ser separados antes da preservação e mantidos em nitrogênio líquido para posterior análise microbiológica. A flora bentônica associada aos rodolitos também deverá ser triada. Para identificação dos grupos taxonômicos (algas calcárias e macroalgas) deverá ser utilizada bibliografia específica e quando necessário, amostras específicas deverão ser enviadas a especialistas. A partir dos dados obtidos, deverão ser determinados: - a riqueza S da comunidade, a diversidade α aparente de Shannon-Hill e a diversidade α real de Shannon-Wiener, e a Dominância de Simpson; a similaridade deverá ser determinada pelo o índice de Kulczynski.

Nas mesmas amostras deverão ser separadas amostras para testes de toxicidade, seguindo a metodologia definida no Anexo 1 deste Termo de Referência.

Referente aos rodolitos, deverá ser realizado levantamento taxonômico e quantitativo da flora e fauna associada aos rodolitos e os fundos formados pelos mesmos. Ainda com relação à fauna bentônica associada, deverá ser realizada a integração deste grupo aos estudos específicos para esses organismos, descritos nesse e demais termos de referência apresentados.

Para monitoramento da fauna e flora, deverá ser realizada análise desses organismos associado ao material coletado e nos fundos de rodolitos, deverão ser instaladas pelo menos 10 estruturas de placa de incrustação do tipo “CAU” (Calcification Acidification Unit), a serem distribuídas em diferentes localidades e habitats. O CAU compreende duas placas paralelas (10X10 cm confeccionadas com PVC cinza Tipo I, mimetizando a complexidade estrutural dos recifes coralíneos (i.e. diferentes regimes de sedimentação e luminosidade). Cada CAU deverá ser instalado e retirado dentro de um período máximo de 12 anos. A composição e a abundância dos organismos colonizados nas estruturas deverão ser analisadas e comparadas com os organismos dominantes no habitat natural adjacente. Nos locais de instalação dos CAUs deverão ser também instalados dataloggers, os quais fornecerão um registro acurado da temperatura, turbidez e luminosidade e do pH em cada local durante todo o período de incubação das placas em cada sítio.

Estudos de ecotoxicologia deverão ser realizados, visando avaliar possíveis efeitos fisiológicos decorrentes da contaminação da água por metais e consequente acumulação desses metais nos organismos, avaliando a concentração de metais e biomarcador de dano biológico (lipoperoxidação).

Em pontos específicos, já citados no item Área de Estudo, deverá ser realizada análise físico-química, visando a correlação de dados.

3.6.4. Fundos Recifais

A caracterização de comunidades bentônicas de fundos recifais deverá ser feita com base na estimativa da cobertura relativa do substrato utilizando a metodologia de fotografoquadrado em parcelas fixas (cf. Francini-Filho *et al.*, 2008). Cada amostra deverá ser composta por um mosaico de 15 fotos de alta resolução, somando uma área de 70 cm². Serão amostrados 10 quadrados fixos (delimitados permanentemente por pinos metálicos fixados ao substrato) por habitat (topo e parede), os quais deverão ser distribuídos aleatoriamente antes da fixação. A coleta de amostras deverá ser determinada em campo

para posterior análise do impacto. As coletas deverão ser realizadas nos fundos recifais potencialmente impactados, os chamados Recifes Esquecidos, localizados a cerca de 60km ao norte da foz do Rio Doce, na região de Itaúnas, e nas estruturas recifais localizadas na APA Costa das Algas e no RVS de Santa Cruz..

Para determinação de taxas de sedimentação e composição do material sedimentar, 5 armadilhas de sedimento serão instaladas na superfície dos recifes. Em cada recife monitorado, deverão ser instalados ainda sensores de turbidez e temperatura paramonitoramento de condições abióticas. O material coletado nas armadilhas deverá ser analisado para composição mineralógica, geoquímica de metais e granulometria.

Em cada recife monitorado, deverão ser coletadas amostras de água para análises geoquímicas de metais, orgânicos e elementares. O monitoramento nos recifes deve ser feitos em no mínimo 3 estruturas, com uma frequência trimestral no primeiro ano. No segundo ano, após avaliação, a frequência passaria para semestral.

A avaliação da condição fisiológica dos corais (i.e. eficiência fotossintética das zooxantelas) deverá ser realizada *in situ* através da técnica de Fluorometria de Amplitude de Pulso Modulada (APM) utilizando-se um fluorômetro subaquático, DIVING-PAM Underwater Fluorometer (Walz GmbH, Germany). Este equipamento mede o Rendimento de Fluorescência (F) e o Máximo Rendimento (Fm), gerando assim uma estimativa do rendimento fotossintético das zooxantelas associadas aos corais. Deverão ser avaliados recifes submetidos a diferentes regimes oceanográficos (próximos e afastados da costa), em diferentes profundidades, e em diferentes condições (branqueados, doentes e saudáveis).

O estudo também prevê a detecção de bioindicadores de impactos ambientais em corais e análises de concentrações de metais nestes organismos. Será realizado o monitoramento da comunidade microbiana total associada aos corais (muco dos corais e coluna d'água adjacente), que poderá apontar a presença de sedimentos e/ou de impactos presentes nas diferentes áreas amostradas, que poderiam ser rastreados em áreas adjacentes.

O monitoramento dos fundos recifais (percentual de cobertura por organismos bentônicos, corais e algas; estado de saúde, densidade de recrutas de corais, eficiência fotossintética, etc.), deverá ser realizado trimestralmente, permitindo melhor acompanhamento da dinâmica de vida de tais organismos e suas respostas às forças em atuação na região.

Será realizada a caracterização e comparação genética e ecotoxicológica entre os organismos alvos do monitoramento. Esta comparação visa quantificar ou qualificar o impacto entre os organismos das regiões próximas à foz do Rio Doce daqueles presentes em fundos recifais da APA Costa das Algas e do RVS de Santa Cruz, considerando a

conectividade oceanográfica e o comportamento de populações de espécies marinhas como metapopulações.

Para a APA Costa das Algas e RVS de Santa Cruz, a malha amostral para o estudo dos fundos recifais encontra-se descrita na Tabela03 e na Figura 04.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSCHUTZ, P.; DEBORDE, J. Spectrophotometric determination of Phosphate in Matrices from Sequential Leaching of Sediments. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 14, p. 245-256, 2016.

ALZAGA, R., MESAS, A., ORTIZ, L., BAYONA, J.M. Characterization of organic compounds in soil and water affected by pyrite tailing spillage. **Science of The Total Environment**, v. 242, n. 1-3, p. 167–178, dez. 1999.

ARAUJO, A. C.; VIANA, P. R. M.; PERES, A. E. C. Reagents in Iron Ores Flotation. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 219-224, 2005.

ARAUJO, A. C.; YOSHIDA, M. I.; TAKAHASHI, J. A.; CARVALHO C. F.; STAPELFELDT, F. Biodegradation Studies on Fatty Amines Used for Reverse Flotation of Iron Ore. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 151-155, 2010.

ARMSTRONG, F. A. J.; STEARNS, C. A.; STRICKLAND, J. D. H. The Measurement of Upwelling And Subsequent Biological Processes by Means of the Technicon Autoanalyzer and Associated Equipment. **Deep-Sea Research**, v. 14, p. 381-389, 1967.

AZAM, S.; LI, Q. Tailings Dam Failures: A Review of the Last One Hungred Years. **Geotechnical News**, p. 50-53, Dec. 2010.

BARBOSA, F. A. R. & PADISÁK, J. Algumas considerações sobre desenho amostral para estudos de longa duração, pp: 343-351, In: Bicudo, C. E. de M. & Bicudo, D. de C. 2004 Amostragem em Limnologia, São Carlos, RIMA Ed. 371 p

BERNHARDT, H., WILHELMS, A. The continuous determination of low level iron, soluble phosphate and total phosphate with the AutoAnalyzer. **Technicon Symposia**, v. 1, p. 385-389, 1967.

BUFFLAP, S. E. & ALLEN, H. E. (1995). Sediment pore water collection methods for trace metal analysis: a review. *Water Research*, 29, 165-177.

CHOSTAK, C.L.; CAMPOS, M.S.; SILVA, S.B.; ABATE, G.; GRASSI, M.T. Modified DGT devices using alternative materials for the speciation of trace elements in natural waters. **Química Nova**, 38, 356, 2015.

COSTA, A. T. **Geoquímica das águas e dos sedimentos da bacia do Rio Gualaxo do Norte, Leste-Sudeste do quadrilátero ferrífero (MG): Estudo de uma área afetada por atividades de extração mineral**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Evolução Crustal e Recursos Naturais. Universidade Federal de Ouro Preto, 2001.

DAVISON, W.; ZHANG, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, 367, 546, 1994.

DOS ANJOS, V.E.; ABATE, G.; GRASSI, M.T. Comparação da labilidade de metais empregando voltametria, difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e modelo computacional. **Química Nova**, 33, 1307, 2010.

DOS ANJOS, V.E.; ABATE, G.; GRASSI, M.T. Potentiality of the use of montmorillonite in diffusive gradients in thin films (DGT) devices for determination of labile species of Cu, Cr, Cd, Mn, Ni, Pb, and Zn in natural waters. **Braz. J. Anal. Chem.**, 04, 187, 2011.

FRÉMION, F.; COURTIN-NOMADE, A.; BORDAS, F.; LENAIN, J.F.; JUGÉ, P.; KESTEN, T.; MOURIER, B. Impact of sediments resuspension on metal solubilization and water quality during recurrent reservoir sluicing management. **Science of the Total Environment**, 562 201–215. 2016.

GIMPEL, J.; ZHANG, H.; DAVISON, W.; EDWARDS, A. C. In situ trace metal speciation in lake surface waters using DGT, dialysis, and filtration. **Environmental Science & Technology**, 37, 138, 2003.

KEMP, A. L. W., THOMAS, R. L., DELL, C. I. & JAQUET, J. M. (1976). Cultural Impact on Geochemistry of Sediments in Lake Erie. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 440-462.

KOROLEFF, F. Direct determination of ammonia in natural waters as Indophenol Blue. **International Conference of the Exploration of the Sea**, n.9, 1969.

KOSSOF, D.; DUBBIN, W. E.; ALFREDSSON, M.; EDWARDS, M. G.; HUDSON-EDWARDS, K. A. Mine Tailings Dams: Characteristics, Failure, Environmental Impacts, and Remediation. **Applied Geochemistry**, v. 51, p. 229-245, 2014.

MACKLIN, M. G.; BREWER, P. A.; BALTEANU, D.; COULTHARD, T. J.; DRIGA, B.; HOWARD, A. J.; ZAHARIA, S. The Long Term Fate and Environmental Significance of Contaminant Metals Released by the January and March 2000 Mining Tailings Dam Failures in Maramureş County, Upper Tisa Basin, Romania. **Applied Geochemistry**, v. 18, p. 241-257, 2003.

MACKLIN, M. G.; BREWER, P. A.; HUDSON-EDWARDS, K. A.; BIRD, G.; COULTHARD, T. J.; DENNIS, I. A.; LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; TURNER, J. N. A Geomorphological Approach to the Management of Rivers Contaminated by Metal Mining. **Geomorphology**, v.79, p. 423-447, 2006.

MARTINELLI, L. A. & KRUSCHE, A. V. Amostragem em Rios, pp: 263-279 In: Bicudo, C. E. de M. & Bicudo, D. de C. 2004 Amostragem em Limnologia, São Carlos RIMA Ed., 371p.

MÜLLER, G. (1969). Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *Geological Journal*, 2, 109-118.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NIEKERK, H. J. V.; VILJOEN, M. J. Causes and Consequences of the Merriespruit and Other Tailings-Dam Failures. **Land Degradation & Development**, v. 16, p. 201-212, 2005.

POURABADEHEI, M; MULLIGAN, C.N. Effect of the resuspension technique on distribution of the heavy metals in sediment and suspended particulate matter. **Chemosphere** 153 58-67. 2016.

POURABADEHEI, M; MULLIGAN, C.N. Resuspension of sediment, a new approach for remediation of contaminated sediment. **Environmental Pollution** 213 63-75. 2016.

RIBEIRO, A. P., FIGUEIREDO, A. M. G., DOS SANTOS, J. O., DANTAS, E., COTRIM, M. E. B., FIGUEIRA, R. C. L., SILVA, E. V. & WASSERMAN, J. C. (2013). Combined SEM/AVS and attenuation of concentration models for the

assessment of bioavailability and mobility of metals in sediments of Sepetiba Bay (SE Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 68, 55-63.

RICO, M.; BENITO, G.; DÍEZ-HERRERO, A. Floods From Tailings Dam Failures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 79-87, 2008.

SOUZA, V. A. & WASSERMAN, J. C. (2015a). Distribution of heavy metals in sediments of a tropical reservoir in Brazil: Sources and fate. *Journal of South American Earth Sciences*, 63, 208-216.

TESSIER, A., CAMPBELL, P. G. C., BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, 51, 844–851. 1979.

UNEP. United Nations Environment Programme. Determination of petroleum of hydrocarbons in sediments. Reference Methods For Marine Pollution Studies. v. 20, 1992.

URE, A. M., QUEVAUVILLER, P., MUNTAU, H. & GRIEPINK, B. (1993). Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51, 135-151.

USEPA. **Method 350.1: Determination of Ammonia Nitrogen by Semi-automated Colorimetric**. Disponível em: < <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-3501.pdf>>.

USEPA. **Method 353.2, Revision 2.0: Determination of Nitrate-Nitrite Nitrogen by Automated Colorimetry**. Disponível em: < https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_353-2_1993.pdf>.

USEPA. **Method 365.5: Determination of Orthophosphate in Estuarine and Coastal Waters by Automated Colorimetric Analysis**. Disponível em: < https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=309420>.

USEPA. **Method 366: Determination of Dissolved Silicate in Estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis**. Disponível em:

<<http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-366.pdf>>.

USEPA. Method 3015A: Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3015a.pdf>USEPA.

USEPA. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf>

USEPA. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>.

Method 3500c: Organic Extraction And Sample Preparation. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3500c.pdf>

USEPA. Method 3510c: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3510c.pdf>

USEPA. Method 3540c: Soxhlet Extraction. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em:

<http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>, 1996.

USEPA. Method 6010C: Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-6010c.pdf>

USEPA. Method 6020A: Inductively coupled plasma - mass spectrometry. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-6020a.pdf>

USEPA. Method 8082a: Polychlorinated Biphenyls (Pcbs) By Gas Chromatography. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/8082a.pdf>

USEPA. **Method 8081b: Organochlorine Pesticides By Gas Chromatography.** U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8081b.pdf>

USEPA. **Method 8270d: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).** U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>, 2007.

VALDERRAMA, J. C. The Simultaneous Analysis of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Natural Waters. **Marine Chemistry**, v. 10, p. 109-122, 1981.

VICQ, R.; MATSCHULLAT, J.; LEITE, M. G. P.; JUNIOR, H. A. N.; MENDONÇA, F. P. C. Iron Quadrangle Stream Sediments, Brazil: Geochemical Maps and Reference Values. **Environmental Earth Science**, v.74, p. 4407-4417, 2015.

WASSERMAN, J. C. & MOUTELLA, A. C. C. (2004). Attenuation of Metallic Concentrations Model Applied to a Polluted Bay in Brazil. In: PORTA, A. & PELLEI, M. (eds.) Proceedings of the Second International Conference on Remediation of Contaminated Sediments. Columbus: Battelle Press.

WASSERMAN, J. C. & QUEIROZ, E. L. (2004). The attenuation of concentrations model: A new method for assessing mercury mobility in sediments. *Quimica Nova*, 27, 17-21.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurements of trace metals in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, 67, 3391, 1995.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Diffusional characteristics of hydrogel used in DGT and DET techniques. **Analytica Chimica Acta**, 398, 329, 1999.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. **Analytical Chemistry**, 72, 4447, 2000.

ZHANG, H.; DAVISON, W. In situ speciation measurements. Using diffusive gradients in thin films (DGT) to determine inorganically and organically complexed metals. IUPAC, **Pure and Applied Chemistry**, 73, 9, 2001.