

Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I

PROTOCOLO DE ANÁLISES

Coordenação Geral

Adalto Bianchini

Alex Cardoso Bastos

Edmilson Costa Teixeira

Eustáquio Vinícius de Castro

Jorge Abdala Dergam dos Santos

Vitória,

Novembro de 2019

COORDENAÇÃO

Anexo 1

Adalto Bianchini (FURG)

Anexo 3

Fabian Sá (UFES)

Gilberto Fonseca Barroso (UFES)

Subprojetos

Alessandra Delazari Barroso (FAESA)

Alex Cardoso Bastos (UFES)

Ana Cristina Teixeira Bonecker (UFRJ)

Anderson Geyson Alves de Araújo (UFES)

Björn Gucker (UFSJ)

Camilo Dias Júnior (UFES)

Daniel Rigo (UFES)

Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna (UFOP)

Gilberto Amado Filho (IPJB) in memorian

Gilberto Fonseca Barroso (UFES)

Iola Gonçalves Boechat (UFSJ)

Leila Lourdes Longo (UFRB)

Leonardo Tavares Salgado (IPJB)

Luís Fernando Loureiro (UFES)

Marco Aurélio Caiado (UFES)

Renato David Ghisolfi (UFES)

Renato Rodrigues Neto (UFES)

Rodrigo Leão de Moura (UFRJ)

Valéria da Silva Quaresma (UFES)

Valéria de Oliveira Fernandes (UFES)

Vanya Marcia Duarte Pasa (UFMG)

Anexo 4

Jacqueline Albino (UFES)

Subprojetos

Karla Costa (UFES)

Maria Tereza Carneiro (UFES)

Anexo 5

Diolina Moura Silva (UFES)

Mônica Tognella (UFES)

Anexo 6

Agnaldo Silva Martins (UFES)

Subprojetos

Ana Paula Cazerta Farro (UFES)

Leandro Bugoni (FURG)

Sarah Vargas (UFES)

Anexo 7

Maurício Hostim (UFES)

Jorge Dergam (UFV)

Subprojetos

Carlos W. Hackradt (UFSB)

Fabiana Felix Hackradt (UFSB)

Jean-Christophe Joyeux (UFES)

Luis Fernando Duboc (UFV)

Anexo 8

Heitor Evangelista (UERJ)

Coordenação Técnica (CTEC)

Alex Cardoso Bastos

Lara Gabriela Magioni Santos

Laura Silveira Vieira Salles

Tarcila Franco Menandro

Coordenação Escritório de Projetos

Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro

Patrícia Bourguignon Soares

Paulo Roberto Filgueiras

Valdemar Lacerda Junior

Walter Luiz Alda Junior

Coordenação Núcleo de Atuação Integrada em Rede (NAIR)

Edmilson Costa Teixeira

Karla Libardi Gallina

Andressa Christiane Pereira

Anna Paula Lage Ribeiro

Caroline De Marchi Pignaton

Paulo Eduardo Marques

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Objetivo geral	8
2. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA SEGURANÇA EM ANÁLISE DE DADOS.....	8
3. PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS OU DESEMPENHO ANALÍTICO	9
4. PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DADOS	11
4.1. Anexo 1 - Análise ecotoxicológica dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem Mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas	11
4.1.1. Determinação de Carbono orgânico dissolvido e parâmetros físico-químicos nas amostras de água.....	11
4.1.2. Análises das concentrações de elementos traços em amostras de água, sedimentos e biota (invertebrados, peixes, aves e quelônios).....	12
4.1.3. Determinação de organoclorados, organobromados e HPAS em amostras de quelônios	14
4.1.4. Ensaio ecotoxicológico com amostras de sedimento e água.....	15
4.1.5. Avaliação da microbiota na água, sedimentos e corais.....	94
4.1.6. Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes.....	95
4.2. Anexo 3 - Monitoramento ambiental no rio Doce, área estuarina e marinha – Sistema Aquático Marinho	103
4.2.1. Matriz coluna d'água.....	103
4.2.2. Matriz sedimento superficial	134
4.2.3. Matriz sedimento testemunho.....	151
4.2.4. Matriz biota.....	153
4.2.5. Matriz leito marinho.....	185
4.3. Anexo 3 - Monitoramento ambiental no rio Doce, área estuarina e marinha – Sistema Aquático Dulcícola.....	189
4.3.1. Matriz coluna d'água	189
4.3.2. Matriz sedimento superficial	195

4.3.3. Matriz sedimento testemunho.....	195
4.3.4. Matriz biota.....	196
4.4. Anexo 4 - Monitoramento da praia e antepraia adjacentes a desembocadura do rio Doce	200
4.4.1. Monitoramento morfológico e sedimentológico.....	200
4.4.2. Monitoramento da qualidade química das areias	207
4.4.3. Monitoramento da fauna bentônica	211
4.5. Anexo 5 - Alterações ecológica na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce.....	212
4.5.1. Manguezal.....	212
4.5.2. Restinga.....	227
4.6. Anexo 6 - Monitoramento ambiental de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do rio Doce.....	234
4.6.1. Monitoramento com veículos aéreos não tripulados	234
4.6.2. Monitoramento de aves marinhas.....	236
4.6.3. Cetáceos	242
4.6.4. Tartaruga Marinhas.....	249
4.7. Anexo 7 - Monitoramento da ictiofauna dulcícola, marinha e estuarina.....	252
4.7.1. Sistema aquático dulcícola	252
4.7.2. Sistema aquático marinho.....	255
4.8. Anexo 8 - Monitoramento da sedimentação no Parque Nacional marinho de Abrolhos	271
4.8.1. Filtragem da água superficial coletada.....	271
4.8.2. Definição de assinatura geoquímica (por isótopos radiogênicos Sr/Nd)	272
4.8.3. Análise da abundância relativa elementar em micro-partículas através de MEV+EDS 277	
4.8.4. Razão elementar Fe: Mn como marcador da concentração/dispersão da lama de minério da samarco em abrolhos	277
5. REFERÊNCIAS	278
6. APÊNDICE	294

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Termo de Referência 4 Programas de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. ...8	8
Quadro 2. Composição do meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972).....19	19
Quadro 3. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica.20	20
Quadro 4. Preparo das soluções-teste com águas de amostra ambiental e o meio WC.....21	21
Quadro 5. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com algas marinhas.26	26
Quadro 6. Preparo das soluções-teste com águas de amostra ambiental e meio Guillard f/2. ...27	27
Quadro 7. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência.31	31
Quadro 8. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência.....31	31
Quadro 9. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.32	32
Quadro 10. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.35	35
Quadro 11. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência. ...38	38
Quadro 12. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência...38	38
Quadro 13. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.39	39
Quadro 14. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.41	41
Quadro 15. Parâmetros da água para manutenção dos reprodutores e diluição das amostras e substâncias de referência.44	44
Quadro 16. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.46	46
Quadro 17. Resumo dos requisitos para o ensaio.47	47
Quadro 18. Preparo do meio M3. Preparar 1 L e armazenar em geladeira.50	50
Quadro 19. Parâmetros da água para manutenção dos reprodutores e diluição das amostras e substâncias de referência.50	50
Quadro 20. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência...51	51
Quadro 21. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.52	52
Quadro 22. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.54	54
Quadro 23. Parâmetros da água para manutenção e diluição.56	56
Quadro 24. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência...57	57
Quadro 25. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.59	59
Quadro 26. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.61	61
Quadro 27. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência...66	66
Quadro 28. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.66	66
Quadro 29. Resumo dos requisitos para o ensaio com gametas – fertilização67	67
Quadro 30. Resumo dos requisitos para o ensaio crônico de desenvolvimento embrio-larval..69	69
Quadro 31. Parâmetros da água para manutenção e diluição.72	72
Quadro 32. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência...74	74
Quadro 33. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.75	75

Quadro 34. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.	77
Quadro 35. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência. ...	80
Quadro 36. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência. ...	80
Quadro 37. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência.	81
Quadro 38. Resumo dos requisitos para o ensaio com amostra ambiental.	83
Quadro 39. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência. ...	89
Quadro 40. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência. ...	89
Quadro 41. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência.	90
Quadro 42. Resumo dos requisitos para o ensaio com amostra ambiental.	93
Quadro 43. Lista dos biomarcadores a serem analisados nas amostras de organismos coletados nas diferentes áreas de monitoramento.	95
Quadro 44. Íons de quantificação dos 16 HPA e padrões internos.	122
Quadro 45. Etapas de extração e cada extrato a ser analisado por colorimetria.	137
Quadro 46. Comparação entre as diferentes frações obtidas pelo método de extração sequencial proposto por Tessier et. al. (1979) e método BCR.	139
Quadro 47. Íons de quantificação dos 16 HPA e padrões internos.	143
Quadro 48. Especificação da malha das peneiras para o peneiramento a seco.	201
Quadro 49. Ficha de Observação para caracterização da Megafauna através dos vídeos editados do Drone Transect, e/ou dos vídeos completos do Drone Behavior.	235
Quadro 50. Exemplo de lista de conferência de amostras de peixes e crustáceos coletados para o estudo e monitoramento da ictiofauna marinha (TR 4 – Anexo 7).....	255
Quadro 51: Iniciadores (primers) utilizados na otimização das reações de amplificação para a região controle do gene mitocondrial (Dloop), com as sequências correspondentes e autores	260
Quadro 52: Relação dos 80 locos de microssatélites adquiridos para caracterização da diversidade genética de peixes recifais e estuarinos	261
Quadro 53. Destinação das amostras coletadas durante o “Estudo e monitoramento ambiental das áreas dulcícola-ES, estuarina e marinha (anexo 7 – ictiofauna) sub-projeto: Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha”, coordenado pelo Prof. Maurício Hostim Silva (UFES campus São Mateus - CEUNES)	269
Quadro 54. Contatos dos professores responsáveis pelo “Estudo e monitoramento ambiental das áreas dulcícola-ES, estuarina e marinha (anexo 7 – ictiofauna) sub-projeto: Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha”, coordenado pelo Prof. Maurício Hostim Silva (UFES campus São Mateus - CEUNES)	269
Quadro 55. Exemplo de etiqueta para identificação de amostras	270

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Daphnia magna</i>	36
Figura 2. a) <i>Daphnia</i> spp com efípio; b) efípios liberados.	36
Figura 3. <i>Danio rerio</i> adulto.....	55
Figura 4. <i>Danio rerio</i> fêmea (acima) e macho.	55
Figura 5. Larva de zebrafish <i>Danio rerio</i>	56
Figura 6. Ovo fecundado.....	62
Figura 7. Óvulo não fecundado	63
Figura 8. <i>Poecilia vivipara</i> fêmea (maior) e juvenil (menor) e Sistema de cultivo de <i>P. vivipara</i>	71
Figura 9. Fêmea ovada e não ovada.	84
Figura 10. Náuplio (a) e copepodito (b).....	84
Figura 11. Indivíduo fêmea com aproximadamente 2,5 mm de tamanho corpóreo total.	86
Figura 12. Indivíduo macho com aproximadamente 3 mm de tamanho corpóreo total.	86
Figura 13. Manifold Nitrito-Nitrato.....	113
Figura 14: Configuração do Manifold para ortofosfato.	115
Figura 15: Configuração do Manifold para análise de silicato	117
Figura 16: Configuração do Manifold para análise de nitrogênio amoniacal.	119
Figura 17: Esquema representativo do dispositivo DGT comercial	132
Figura 18. Exemplo do arquivo de embarcação para o levantamento batimétrico.	185
Figura 19. Exemplo de curva de nível.	186
Figura 20. Exemplo para um perfil de velocidade do som.	187
Figura 21. Exemplo de dados batimétricos com dados espúrios para serem retirados.	188
Figura 22. Ficha de análise sedimentológica.	202
Figura 23. Ficha de análise morfoscópica.....	203
Figura 24. Ficha de análise de composição carbonática.....	204
Figura 25. Estrutura para separação de minerais pesados pelo método gravitacional. a) estrutura de apoio; b) vidro relógio; c) funil de separação; d) minerais leves; e) líquido de separação (bromofórmio); f) suporte do funil; g) tubo de borracha; h) minerais pesados; i) pinça que permite ou não a passagem do líquido e da fração pesada; j) suporte do funil de filtração; k) funil de filtração; l) frasco de recepção.	205
Figura 26. Ficha de análise de minerais pesados.....	206
Figura 27: Sistema de filtragem com <i>Manifold</i>	272

1. INTRODUÇÃO

O Acordo de Cooperação Técnica-Científica e Financeira celebrado entre a Fundação Espírito-Santense de Tecnologia - FEST e a Fundação RENOVA para a execução do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área Ambiental I (PMBA) por meio da Rede Rio Doce Mar - RRDM visa verificar a evolução do impacto do rejeito de minério de ferro nos ecossistemas e biodiversidade associada, conforme disposto no Termo de Referência N. 4 e seus anexos (Quadro 1). Para fins de qualificação e padronização das análises laboratoriais a RRDM detalha os procedimentos de análise de dados neste documento.

Quadro 1. Termo de Referência 4 Programas de Monitoramento da Biodiversidade Aquática.

Anexo	Tema	Obs
1	Monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pela lama oriunda do rompimento da barragem de Mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas	
2	Estudo e monitoramento do ambiente dulcícola da Área Ambiental I	Suspenso
3	Estudo e monitoramento ambiental no Rio Doce, área estuarina e marinha	
4	Monitoramento de potenciais impactos do rejeito de minério de ferro na praia e antepraia adjacentes da desembocadura do Rio Doce	
5	Alterações ecológicas na dinâmica dos manguezais e vegetação de restinga sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce	
6	Monitoramento de mamíferos, tartarugas e aves marinhas associados à foz do Rio Doce, plataforma continental e áreas protegidas adjacentes	
7	Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha e estuarina	
8	Monitoramento da sedimentação no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e regiões relacionadas	

1.1.OBJETIVO GERAL

Detalhar os procedimentos para análise em campo e em laboratório das amostras coletadas no âmbito do PMBA.

2. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA SEGURANÇA EM ANÁLISE DE DADOS

Como forma de monitorar o desempenho técnico dos laboratórios de análises químicas e avaliar a implementação das metodologias que compõem o Programa de Monitoramento da Biodiversidade, foi realizado um Programa de Ensaio de Proficiência (PEP) da Rede Metrológica de Minas Gerais (RMMG) ao longo da implementação do Projeto.

A RMMG é acreditada pela CGCRE, desde maio de 2018, como Provedor de Ensaio de Proficiência conforme a norma ABNT NBR ISO/IEC 17043. A participação dos laboratórios da RRDM em atividades de ensaio de proficiência é um dos mecanismos de controle da qualidade dos resultados

previstos na NBR ISO/IEC 17025. Um dos grandes benefícios advindos desta participação é a avaliação externa e independente da qualidade de seus resultados de ensaios.

O PEP é uma ferramenta necessária e indispensável utilizada para avaliar e monitorar a confiabilidade metrológica dos ensaios realizados pelos laboratórios e viabilizar a possibilidade do intercâmbio de conhecimentos técnicos entre os laboratórios participantes. Para tanto, o objetivo foi apresentar de forma detalhada a operação do planejamento e desenvolvimento do Programa de Ensaio de Proficiência da Rede Rio Doce Mar e estabelecer os requisitos e orientações para a realização do mesmo, tendo como norteadores os seguintes objetivos específicos:

- 1) Determinar o desempenho individual dos laboratórios para os ensaios de metais determinados pelos mesmos;
- 2) Avaliar a confiabilidade e harmonização dos resultados obtidos;
- 3) Agregar valor ao controle da qualidade dos laboratórios;
- 4) Subsidiar o laboratório na detecção e identificação de problemas ocorridos nas execuções dos ensaios, possibilitando a implementação das ações corretivas pertinentes e a melhoria contínua no laboratório.

Os quatro laboratórios submetidos ao programa tiveram diferentes níveis de aproveitamento para os diferentes metais analisados. Todos os resultados se encontram no Relatório da 6ª Rodada (33/2019 – 22/01/2019) do Programa de Ensaio de Proficiência RMMG (Meio Ambiente – Água e Efluente, AA-06.2018). A partir do Relatório emitido pela RMMG, foi elaborado um relatório interno por equipe especializada da RRDM com o objetivo de apresentar um resumo da participação dos laboratórios que a compõem (APÊNDICE).

Apesar dos laboratórios pertencentes a RRDM terem apresentados resultados discordantes para alguns parâmetros analisados, ressalta-se que todos seguem procedimentos internos para acompanhamento e validação dos seus resultados, como descritos abaixo.

3. PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS OU DESEMPENHO ANALÍTICO

Existem diversos parâmetros analíticos para validação de métodos, ou também conhecidos como como parâmetros de desempenho analítico, tais como: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Neste tópico são apresentados os parâmetros analíticos utilizados nas análises químicas descritas ao longo do documento. Diferentes organizações internacionais publicaram documentos técnicos que definem guias de orientações para a validação de métodos analíticos, entretanto, apesar de haverem diferenças, muitas definições sugeridas corroboram entre os documentos propostos. Desta forma,

assumimos neste protocolo algumas das definições propostas pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), as quais são descritas a seguir.

- Linearidade

Através de sinais medidos para massas ou concentrações de um determinado analito é possível obter uma relação matemática expressa como uma equação de reta ($y=ax + b$) denominada curva analítica, sendo esta composta por no mínimo cinco pontos. A regressão linear é o método matemático utilizado para a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica gerada a partir deste conjunto de medições experimentais, onde um coeficiente de correlação maior que 0,999 pode ser considerado como um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

- Padronização interna

O padrão interno é uma determinada substância ou componente químico adicionado em uma mesma quantidade conhecida tanto nas soluções padrão de concentrações da substância de interesse, como nas amostras a serem analisadas. Este padrão interno a ser utilizado deve ser similar a substância a ser quantificada e não fazer parte da amostra, sendo seu uso essencial para corrigir efeitos interferentes em vários procedimentos de análise instrumental, melhorando assim a qualidade dos resultados analíticos e corrigindo possíveis erros associados às interferências físico-químicas que podem ser causadas pela matriz.

- Exatidão

A exatidão do método pode ser avaliada será avaliada pelo processo do uso de materiais de referência certificados (CRM), os quais são acompanhados de um certificado constando o valor de concentração, ou outra grandeza, de uma determinada substância ou parâmetro, e uma incerteza associada. Desta forma, a média e o desvio padrão de uma série de replicatas de uma amostra padrão como valores obtidos pelos laboratórios deve ser comparados com os valores certificados do material de referência, possibilitando assim a verificação da exatidão do método. Ressalta-se que para efeito comparativo deve-se utilizar CRM similares às matrizes ambientais das amostras a serem analisadas, por exemplo, sedimentos fluviais, estuarinos e marinhos, água marinha, materiais biológicos diversos, entre outros.

- Limite de Detecção (LD)

A menor concentração que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, de uma substância em análise utilizando um determinado procedimento experimental representa o Limite de detecção (LD). Para sua determinação será utilizado o método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo expresso pela seguinte fórmula:

$$LD = 3,3 \times SD/a$$

Onde: SD (estimativa do desvio padrão do branco de preparo) e a (inclinação ou coeficiente angular da curva analítica).

- Limite de Quantificação (LQ)

A menor concentração de uma substância em análise que pode ser medida por um determinado procedimento experimental é denominada Limite de Quantificação (LQ). O mesmo critério do LD será aplicado para o LQ, ou seja, utilizando a relação do desvio padrão do branco de preparo e a inclinação da curva analítica, a partir da seguinte Equação 1:

$$LD = 10 \times SD/a$$

Equação 1

Onde: SD (estimativa do desvio padrão do branco de preparo) e a (inclinação ou coeficiente angular da curva analítica).

Este é o método estatisticamente mais confiável para sua determinação, entretanto a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ.

4. PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DADOS

4.1. ANEXO 1 - ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICO DOS IMPACTOS CAUSADOS PELA LAMA ORIUNDA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM MARIANA (MG) EM REGIÕES DULCÍCOLAS, ESTUARINAS E MARINHAS

4.1.1. Determinação de Carbono orgânico dissolvido e parâmetros físico-químicos nas amostras de água

A concentração de carbono orgânico será determinada pelo método de oxidação por combustão catalítica na temperatura de 680 °C. Todo carbono presente na amostra líquida é oxidado a dióxido de carbono (CO₂), que é detectado no detector de infravermelho não dispersivo (NDIR). A área do pico de CO₂ detectada é proporcional à concentração de carbono total na amostra, de acordo com uma curva de calibração. As determinações serão realizadas nas amostras de água filtradas (0,45 µm de malha) e acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1%) utilizando-se o analisador de Carbono TOC-VCPH.

A concentração de cloretos será determinada utilizando-se um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Cloreto, CHEMets, EUA), baseado no método do tiocianato férrico (Zall et al, 1956)). A concentração de sulfatos será determinada utilizando-se um kit comercial de reagentes (Vacu-vials Sulfato, CHEMets, EUA), baseado no método turbidimétrico (Tabatabai, 1974). A alcalinidade total será determinada por titulação com solução padrão ácida, utilizando-se um kit comercial de reagentes baseado no método titrimétrico (APHA, 1989). As determinações de pH, O₂ dissolvido, condutividade (salinidade) e temperatura foram determinados no momento da coleta utilizando-se sonda multiparâmetros portátil.

4.1.2. Análises das concentrações de elementos traços em amostras de água, sedimentos e biota (invertebrados, peixes, aves e quelônios)

As determinações das concentrações dos elementos traços As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn nas amostras de água, sedimento, invertebrados (indivíduos inteiros ou tecidos), peixes (tecidos), quelônios (tecidos) e aves (tecidos) serão realizadas utilizando-se forno de grafite acoplado a espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Por sua vez, a determinação da concentração de Hg nestas amostras será realizada pelo método de vapor frio, utilizando-se gerador de hidretos acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica.

- Amostras de água

Para as determinações de As, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn e Zn, as amostras de água filtradas e não filtradas oriundas dos pontos amostrais da Foz do Rio Doce e região costeira adjacente serão dessalinizadas, a fim de minimizar um possível "efeito matriz" associado às altas concentrações de íons presentes na água salgada (Nadella *et al.*, 2009). Para tal, os elementos traços representativos presentes em 1 mL de amostra de água serão precipitados adicionando-se 1 µL de óxido de lantânio (10 mg La/mL) e 7,5 µL de carbonato de sódio (1 M), o que elevará o pH da amostra para aproximadamente 9,8. A solução será então gentilmente agitada em banho-maria (80 °C) por 30 min para promover a floculação do precipitado, na sua maioria constituído de hidróxido de lantânio. A solução resultante será então centrifugada a 3.000 xg por 15 min, sendo que o sobrenadante obtido será descartado. O precipitado remanescente será dissolvido em 1 mL de ácido nítrico (HNO₃, 1 N) ultrapuro (Suprapur, Merck®) e utilizado na determinação da concentração dos elementos traços. Já as amostras de água doce serão analisadas sem a necessidade de pré-processamento.

As concentrações totais e dissolvidas dos elementos traços nas amostras de água serão expressas em µg/L e comparadas com a Resolução CONAMA 357/2005 (CONAMA, 2005), respeitando-se o tipo (água doce, salobra ou marinha) e as classes de qualidade de cada amostra de água em análise.

Para verificar a exatidão das análises, serão realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, serão analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras serão igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, serão utilizadas soluções padrões certificadas do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC) para os elementos traços a serem analisados nos diferentes tipos de águas analisadas (NASS-6: água marinha; SLEW-3: água salobra; SLRS-6: água doce).

Os percentuais de recuperação dos elementos traços nas soluções padrões certificados, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os elementos traços analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn), serão apresentados.

- Amostras de sedimentos

As amostras de sedimentos serão preparadas através de digestão ácida, conforme os procedimentos descritos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996; Method 3050B).

As concentrações dos elementos traços no sedimento serão expressas em $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e $\mu\text{g/g}$ de peso seco (mg/kg de peso seco). Para verificar a acurácia e exatidão das análises, serão realizados controles de qualidade analíticos.

Para tal, serão analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras serão igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, será utilizado material de referência certificado do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC) para os elementos traços a serem analisados (MESS-4). Amostras deste material serão tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras de sedimento coletadas no monitoramento, conforme descrito anteriormente.

Os percentuais de recuperação dos elementos traços presentes no material de referência certificado, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os elementos traços analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn), serão apresentados.

- Amostras de Biota

- Preparo das amostras de biota para determinação de mercúrio

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), as amostras biológicas serão secas em estufa ($45 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) até peso seco constante e logo após serão tratadas a frio com 1 mL de H_2O_2 . Após essa etapa, serão adicionados 5 mL de solução sulfonítrica concentrada ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$; v/v) e as amostras serão então aquecidas em banho-maria a 60°C por 2 h, até a solubilização completa da amostra. Os extratos serão resfriados por 15 min, e 10 mL de KMnO_4 (5%) serão adicionados aos extratos. As amostras serão retornadas ao banho-maria (60°C) por 15 min, e serão então resfriadas em repouso, por uma noite. No dia seguinte, o extrato será reduzido com a adição de 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (HONH_2) a 12%. O extrato final será avolumado com água MilliQ até 14 mL.

- Preparo das amostras de biota para demais elementos traços

As amostras de material biológico serão previamente secas em estufa ($45 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) até peso seco constante e digeridas em ácido nítrico (HNO_3) ultrapuro (Suprapur, Merck®) na proporção de 1 g de peso seco de material biológico para 2 mL de ácido nítrico. O teor de água para cada amostra será obtido.

As amostras serão então submetidas à digestão ácida lenta em tubos plásticos tipo Eppendorf, os quais serão devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora ($45\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a completa digestão das amostras. As amostras contendo o material biológico digerido serão então avolumadas a 1 mL com água ultrapura.

- Determinação

No momento das determinações, caso necessário, as amostras serão diluídas utilizando-se água ultrapura, visando se adequar as concentrações dos elementos traços nas amostras àquelas, presentes nas soluções preparadas com padrões certificados utilizados para calibrar o equipamento.

As concentrações dos elementos traços no material biológico serão expressas em $\mu\text{g/g}$ de peso úmido (mg/kg de peso úmido) e $\mu\text{g/g}$ de peso seco (mg/kg de peso seco).

Os resultados das amostras de músculo de crustáceos e peixes serão comparados com os limites estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC no 42, de 29/08/2013 (ANVISA, 2013), que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.

Para verificar a acurácia e exatidão das análises, serão realizados controles de qualidade analíticos. Para tal, serão analisados "brancos", onde todos os procedimentos para a preparação e análise das amostras serão igualmente realizados, porém na ausência da amostra. Além disso, serão analisados materiais de referência certificados para análise de elementos traços do Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá (NRCC), de acordo com o material biológico analisado (DOLT-5: fígado de peixe; DORM-4: músculo de peixe; TORT-3: hepatopâncreas de lagosta).

Amostras destes materiais serão tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico coletado no monitoramento, conforme descrito anteriormente. Os percentuais de recuperação dos elementos traços presentes nos materiais de referência certificados, bem como os limites de detecção e quantificação do método para os elementos traços analisados (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb e Zn), serão apresentados.

4.1.3. Determinação de organoclorados, organobromados e HPAS em amostras de quelônios

Para a determinação de compostos organoclorados (PCBs e pesticidas clorados), organobromados (PBDEs e MeO-PBDEs) e HPAs (16 prioritários; US EPA) nas amostras de quelônios, as extrações serão realizadas com extratores de Soxhlet com capacidade de 60 mL e balões volumétricos de 250 mL, os quais serão aquecidos ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) individualmente por mantas aquecedoras. Será utilizada uma mistura de solventes (hexano e diclorometano; 1:1; v/v). Serão utilizados cerca de 5 g de amostra (peso úmido).

Os padrões de recuperação a serem utilizados serão o PCB 103 (PCBs e pesticidas), PBDE 181 (PBDEs e MeO-PBDEs) e p-terfenil (HPAs) que serão acionados às amostras no início da extração. O volume final será reduzido à 3 mL e separados em 3 alíquotas de 1 mL cada para dar então prosseguimento às etapas de purificação e fracionamento para cada grupo de compostos a serem determinados separadamente conforme descrito em detalhes em Commendatore *et al.*, 2015 e Ondarza *et al.*, 2014. O conteúdo lipídico das amostras será quantificado por gravimetria. Portanto, as concentrações finais dos compostos organoclorados, organobromados e HPAs serão normalizadas a partir do conteúdo de lipídios na amostra analisada.

As concentrações dos pesticidas e das bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa, com detector de captura de elétrons (GC/ECD). O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

As concentrações dos PBDEs e MeO-PBDEs serão mensuradas utilizando-se cromatógrafo de fase gasosa (GC) acoplado a espectrômetro de massa (MS). O GC será operado no modo de ionização química negativa (ECNI). O metano será utilizado como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadrupolo e interface serão ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS será utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons $m/z = 79$ e 81 (de tri- a hepta-BDEs) e $484,7/486,7$ e $494,7/496,7$ (para BDE 209 e 13C-BDE 209, respectivamente), sendo monitorados durante toda a corrida. O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões certificados de referência e brancos de solventes.

As concentrações dos HPAs serão mensuradas utilizando-se cromatógrafo de fase gasosa (GC) acoplado a espectrômetro de massa (MS). O GC será operado no modo de ionização por elétrons (EI).

4.1.4. Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento e água

a) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 01: Lavagem e descontaminação de material utilizado nos cultivos e ensaios de toxicidade

- Descrição e Aplicação

O presente Procedimento Operacional Padrão (POP) se refere à lavagem de material novo e descontaminação e lavagem de material previamente utilizado nos cultivos e ensaios de toxicidade.

- Lavagem de material novo

O material novo utilizado para os cultivos e nos ensaios com organismos-teste, deve ser lavado com água corrente e em seguida água destilada.

- Descontaminação e lavagem de material usado

A vidraria utilizada com amostras deve seguir uma sequência de procedimentos sucessivos para sua limpeza:

- Lavar com água corrente;
- Deixar 24 h de molho em detergente neutro não fosfatado (EXTRAN) 2%;
- Enxaguar em água da torneira;

- Deixar 24 h de molho no H₂NO₃ 1%;
- Enxaguar em água da torneira;
- Rinsar com acetona;
- Enxaguar com água da torneira;
- Enxaguar finalmente com água destilada;
- Secar em estufa ou temperatura ambiente;
- Tampar o material para evitar entrada de poeira e guardar em local seco.

Todo o material utilizado nos ensaios de toxicidade, com exceção do material descartável, deve seguir os procedimentos de lavagem acima mencionados.

b) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 02: Ensaio de toxicidade crônica com algas de água doce (Chlorophyceae)

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização de ensaios para a determinação da toxicidade crônica de amostras ambientais para microalgas dulcícolas (Chlorophyceae). A base deste documento é a Norma Brasileira ABNT NBR 12648, terceira edição, de 07 de novembro de 2011.

O método consiste na exposição de microalgas verdes unicelulares dilcícolas à diferentes diluições da amostra, durante um período de 72 h. O efeito tóxico é determinado pela inibição do crescimento da biomassa algácea nos recipientes-teste, comparado com o controle, sob as mesmas condições de ensaio.

- Material e equipamentos

- aparelho para obtenção de água ultrapura;
- balança analítica;
- balão volumétrico;
- frasco de Erlenmeyer;
- espectrofotômetro;
- câmaras para contagem celular (Fuchs Rosenthal ou Neubauer), quando utilizado microscópio óptico;
- luxímetro / luminômetro;

- medidor de PH;
- medidor de condutividade;
- pipeta graduada;
- pipeta volumétrica;
- proveta;
- sistema de agitação;
- sistema de esterilização;
- sistema de iluminação que garanta a quantidade de luz necessária para o ensaio;
- termômetro;
- inóculo das algas;
- meio de cultura wc;
- incubadora ou sala climatizada com temperatura e fotoperíodo controlados;
- câmara de fluxo laminar;
- tampões de gaze ou algodão.
- Material biológico
 - Microalgas verdes unicelulares dulcícolas, provenientes de culturas axênicas, mantidas em condições controladas de temperatura e luminosidade;
 - Espécies a serem consideradas para os ensaios são: *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*, *Raphidocelis subcapitata* e *Pediastrum boryanum* (Chlorophyceae).

- Limpeza do material

Qualquer material que venha a entrar em contato com as soluções-teste deve ser feito de vidro ou outro material quimicamente inerte. Tubos de ensaio, béqueres e erlenmeyers podem ser utilizados, havendo padronização no uso (mesmo tamanho/volume, material e fabricante);

O material deve ser lavado antes do uso, de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos abaixo;

Os recipientes lavados devem ser tampados para evitar a entrada de poeira.

Material novo: todo o material novo utilizado no ensaio ou no cultivo dos organismos deve ser limpo conforme os passos a seguir:

- Deixar o material de molho, completamente imerso em solução de HCl 5%;

- Retirar o excesso de HCl do material e lavar abundantemente com água de torneira;
- Enxaguar o material três vezes com água destilada.

Vidrarias em uso nos testes: para a descontaminação e reutilização da vidraria usada nos ensaios, esta deve ser limpa conforme os passos a seguir:

- Lavar a vidraria com detergente neutro. Deixar de molho por 24 h;
- Enxaguar com água da torneira em abundância;
- Rinsar a vidraria com acetona, e retirar o excesso de solvente com água da torneira em abundância;
- Deixar o material de molho, completamente imerso em solução de HCl 5% por 24 h;
- Retirar o excesso de HCl do material e lavar abundantemente com água de torneira;
- Enxaguar o material três vezes com água destilada.

Esterilização: todo material a ser utilizado no ensaio deve ser esterilizado em autoclave, incluindo, meio de cultura, vidrarias e tampões de gaze ou algodão. As culturas devem ser manuseadas sempre em câmara de fluxo laminar e o material usado para manipulação deve ser esterilizado previamente em luz UV por 15 min.

- Soluções

- Água de diluição: água de diluição é a água utilizada para o preparo das soluções-estoque, soluções-teste e o controle. Deve ter a mesma qualidade da água utilizada para os cultivos. A água de cultivo e diluição deve ser ultrapura e preparada em Meio WC, descrito em detalhes na Norma ABNT NBR 12648/2011.

- Soluções-teste: as soluções-teste devem ser constituídas do meio de cultura, do inóculo e das amostras ambientais. O volume final de solução-teste em todos os recipientes deve ser o mesmo. O recipiente-teste pode ser de qualquer capacidade, desde que o volume final de solução-teste não exceda 50% de sua capacidade. Recomenda-se adotar recipientes-teste exatamente de um mesmo tipo ou marca durante um ensaio, visando semelhantes espessuras de parede ou vidro, minimizando assim diferenças na passagem da luz do meio para a solução-teste.

- Cultivo

- Meio de cultivo

O meio de cultivo para o ensaio é o meio WC e está descrito na

Quadro 2. O meio deve ser esterilizado em autoclave diretamente em um único recipiente e, previamente a adição de vitaminas, e então, distribuído nos recipientes-teste previamente esterilizados.

➤ Pré-cultura e inóculo

→ O preparo da pré-cultura deve ser realizado em local asséptico 3 a 7 dias antes do início do ensaio, nas mesmas condições abióticas do ensaio. A pré-cultura de microalga pode ser obtida pelo repique a partir da cultura-estoque: <10% de cultura-estoque em 100 mL em meio líquido esterilizado. Ela deve estar em fase exponencial para ser utilizada. No dia do ensaio, conta-se o número de microalgas na pré-cultura e esta é diluída para uma densidade entre 10^4 a 10^5 células/mL, compondo o inóculo, o qual será adicionado nas soluções-teste. No entanto, antes de se fazer o inóculo, a pré-cultura em fase exponencial de crescimento deve ter sua viabilidade medida;

→ A viabilidade celular é verificada corando uma alíquota da pré-cultura com Vermelho Neutro a uma concentração final de 40 $\mu\text{g/mL}$. Após incubação por duas horas é feita uma contagem de células (200 células no total) onde células coradas de vermelho são consideradas viáveis e células não coradas são consideradas não viáveis. A cultura é considerada adequada para uso nos testes quando atinge viabilidade > 98%;

→ Sob as condições acima a pré-cultura é inoculada ao ensaio.

Quadro 2. Composição do meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972).

Solução principal	mg/L	Traços	mg/L	Vitaminas	mg/L
Ca Cl ₂ ·2H ₂ O	36,76	Na ₂ EDTA	4,36	Thiamin-HC	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	36,97	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15	Biotin	0.0005
NaHCO ₃	12,60	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01	B ₁₂	0.0005
K ₂ HPO ₄	8,71	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022	-	-
NaNO ₃	85,01	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	-	-
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	28,42	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,18	-	-
-	-	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,006	-	-
-	-	H ₃ BO ₃	1,0	-	-

• Ensaio de toxicidade com substância de referência

➤ A sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada realizando um ensaio com substância de referência como: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), dodecil sulfato de sódio (DSS) ou dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇);

➤ O ensaio de sensibilidade a substância referência deve ser realizado conforme as condições do ensaio descritas no Quadro 3;

➤ O valor de toxicidade obtido no ensaio deve estar compreendido em um intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios dos ensaios com substância de referência, com a mesma espécie. Estes dados de sensibilidade atestam a qualidade do lote de organismos a serem usados no ensaio com amostras ambientais;

- Os procedimentos realizados no ensaio referência são os mesmos descritos abaixo para ensaios de toxicidade com amostra ambiental (item g), exceto pelas concentrações que irão depender do químico referência utilizado e da alga a ser testada.

Quadro 3. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica.

Requisitos	Condições
Ensaio	Estático
Biomassa inicial	10 ⁴ a 10 ⁵ cel/mL
Água de diluição	Água processada e/ou meio de cultura
Volume mínimo da solução teste/recipiente	50 mL
Número mínimo de soluções teste ^a	Controle + 5 concentrações para os ensaios com substância de referencia, ou Controle Bruto + 5 diluições da amostral ambiental
Número mínimo de réplicas por solução teste	3
Temperatura	23 °C a 27°C
Iluminação	Fotoperíodo 12C:12E > 4500 lux
Velocidade de agitação	100 a 175 rpm
Efeito observado	Inibição da multiplicação das células algáceas
Expressão dos resultados	CENO(I), CEO(I), VC(I), Clp(I) e FT

- Ensaio de toxicidade crônica com amostra ambiental (água e elutriato)

- Preparo para o ensaio: Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental;

Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente *over night* (aproximadamente 25° C);

- No dia do ensaio preparar o elutriato e as soluções-teste.

Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e meio WC na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de meio que será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio, fazer um volume total de elutriato de 500 mL. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.

- Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;

- Adicionar meio WC e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes de acordo com o Quadro 4. O procedimento deve ser feito para cada réplica;

- Incubar os recipientes-teste a uma temperatura entre 23 °C a 27 °C, sob luz branca com fotoperíodo de 12C:12E;

- Com o objetivo de manter as células em suspensão, recomenda-se que os recipientes-teste permaneçam em um sistema de agitação constante com velocidade contínua de 100 a 175 rpm;
- O ensaio terá a duração de 72 h \pm 2 h;
- No início e fim do ensaio, analisar os seguintes parâmetros de pelo menos um controle:
 - 1) Medir o pH. Caso haja necessidade, ajustar o pH da solução estoque para que deve ficar entre 6.0 e 8,0 no início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários;
 - 2) Contagem celular ao microscópio ou com contador de células;
 - 3) Espectrofotometria, para determinação da densidade celular com leitura da absorbância luminosa em 750 nm;
- No caso de ser utilizado o microscópio, as amostras podem ser preservadas com solução de formol, para posterior determinação do número de células. Utilizar, na preservação de amostras com microalgas formol com concentração final de aproximadamente 4%;
- Amostras coloridas ou turvas podem interferir na determinação da densidade celular por espectrofotometria. Neste caso, preparar uma réplica extra de cada solução-teste, sem algas, para ser utilizada como branco na determinação de sua absorbância.

Quadro 4. Preparo das soluções-teste com águas de amostra ambiental e o meio WC.

Concentração da solução-teste (%)	Amostra ambiental (mL)	Meio de cultura WC (mL)	Pré-Inóculo (10^4 a 10^5 células/mL)	Volume final (mL)
100	49.0	0	1	50
50	24.0	25	1	50
25	11.5	37.5	1	50
12,5	5.2	43.8	1	50
6,25	2.1	46.9	1	50
3,12	0.5	48.4	1	50
Controle	0	49	1	50

- Validação dos resultados

O ensaio deve ser considerado válido se:

- O aumento da biomassa algácea média do controle for no mínimo:
 - 16 vezes superior à biomassa inicial, para 72 h de exposição; ou

- 100 vezes superior à biomassa inicial, para 96 h de exposição; ou
- 30 vezes superior à fluorescência inicial, para 72 h de exposição.
- O coeficiente de variação da biomassa algácea entre as réplicas do controle for menor ou igual:
 - A 20 %.
 - A variação do pH inicial e final no controle não exceder mais de 1,5 unidades.

i) Expressão dos resultados

▪ Cálculo da porcentagem de inibição

Inicialmente, calcular a taxa média de crescimento específico, μ , para cada réplica i, utilizando a Equação 2.

$$\mu = \frac{\ln(N_{tf}) - \ln(N_{ti})}{\Delta t} \times 100$$

Equação 2

Onde:

μ = taxa de crescimento;

N_{ti} = Biomassa no tempo inicial do ensaio;

N_{tf} = Biomassa no tempo final do ensaio;

Δt = diferença entre o tempo final (tf) e tempo inicial (ti).

A biomassa pode ser representada como densidade ótica ou número de células.

Calculando o percentual de inibição:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\mu_i - \mu_c}{\mu_c} \times 100 \text{ Eq (2)}$$

Onde:

μ_i = Taxa específica de crescimento para cada tratamento;

μ_c = Taxa específica de crescimento para o controle.

c) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 03: Ensaio de toxicidade crônica com algas marinhas

• Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização de ensaios para a determinação da toxicidade crônica de amostras ambientais para microalgas marinhas. A base deste documento é a Norma Brasileira ABNT NBR 16181, primeira edição, de 18 de junho de 2013.

O método consiste na exposição de microalgas marinhas a amostra ambiental ou substância química, durante um período de 72 h. O efeito tóxico é determinado pela inibição do crescimento da biomassa algácea nos recipientes-teste, comparado com o controle, sob as mesmas condições de ensaio.

- Material e equipamentos

- aparelho para obtenção de água ultrapura;
- balança analítica;
- balão volumétrico;
- frasco de Erlenmeyer;
- espectrofotômetro;
- câmaras para contagem celular (Fuchs Rosenthal ou Neubauer), quando utilizado microscópio óptico;
- luxímetro / luminômetro;
- medidor de PH;
- medidor de condutividade;
- pipeta graduada;
- pipeta volumétrica;
- proveta;
- sistema de agitação;
- sistema de esterilização;
- sistema de iluminação que garanta a quantidade de luz necessária para o ensaio;
- termômetro;
- inóculo das algas;
- meio de cultura F/2;
- incubadora ou sala climatizada com temperatura e fotoperíodo controlados;
- câmara de fluxo laminar;
- tampões de gaze ou algodão.

- Material biológico

- Microalgas verdes unicelulares dulcícolas, provenientes de culturas axênicas, mantidas em condições controladas de temperatura e luminosidade;
- Espécies a serem consideradas para os ensaios são: *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (CCAP 1077/1C, NIVA BAC 1) ou *Thalassiosira pseudonana* ou *Isochrysis aff. Galbana*.

- Limpeza do material

Qualquer material que venha a entrar em contato com as soluções-teste deve ser feito de vidro ou outro material quimicamente inerte. Tubos de ensaio, béqueres e erlenmeyers podem ser utilizados, havendo padronização no uso (mesmo tamanho/volume, material e fabricante).

O material deve ser lavado antes do uso, de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos abaixo:

- Os recipientes lavados devem ser tampados para evitar a entrada de poeira;
- Material novo: todo o material novo utilizado no ensaio ou no cultivo dos organismos deve ser limpo conforme os passos a seguir:
 - Deixar o material de molho, completamente imerso em solução de HCl 5%;
 - Retirar o excesso de HCl do material e lavar abundantemente com água de torneira;
 - Enxaguar o material três vezes com água destilada.
- Vidrarias em uso nos testes: para a descontaminação e reutilização da vidraria usada nos ensaios, esta deve ser limpa conforme os passos a seguir:
 - Lavar a vidraria com detergente neutro. Deixar de molho por 24 h;
 - Enxaguar com água da torneira em abundância;
 - Rinsar a vidraria com acetona, e retirar o excesso de solvente com água da torneira em abundância;
 - Deixar o material de molho, completamente imerso em solução de HCl 5% por 24 h;
 - Retirar o excesso de HCl do material e lavar abundantemente com água de torneira;
 - Enxaguar o material três vezes com água destilada.
- Esterilização: todo material a ser utilizado no ensaio deve ser esterilizado em autoclave, incluindo, meio de cultura, vidrarias e tampões de gaze ou algodão. As culturas devem ser manuseadas sempre em câmara de fluxo laminar e o material usado para manipulação deve ser esterilizado previamente em luz UV por 15 min.

- Soluções

→ Água de diluição: água de diluição é a água utilizada para o preparo das soluções-estoque, soluções-teste e o controle. Deve ter a mesma qualidade da água utilizada para os cultivos. A água de cultivo e diluição deve ser ultrapura e preparada em Meio Guillard f/2, descrito em detalhes na Norma ABNT NBR 16181/2013.

→ Soluções-teste: as soluções-teste devem ser constituídas do meio de cultura, do inóculo e das amostras ambientais. O volume final de solução-teste em todos os recipientes deve ser o mesmo. O recipiente-teste pode ser de qualquer capacidade, desde que o volume final de solução-teste não exceda 50% de sua capacidade. Recomenda-se adotar recipientes-teste exatamente de um mesmo tipo ou marca durante um ensaio, visando semelhantes espessuras de parede ou vidro, minimizando assim diferenças na passagem da luz do meio para a solução-teste.

- Cultivo

- Meio de cultivo

O meio de cultura estoque e para o ensaio é o meio Guillard f/2 que está detalhado na ABNT NBR 16181. O meio deve ser esterilizado diretamente nos recipientes-teste ou em um único recipiente e, posteriormente, distribuído nos recipientes-teste previamente esterilizados.

- Pré-cultura e inóculo

O preparo da pré-cultura deve ser realizado em local asséptico 3 a 7 dias antes do início do ensaio, nas mesmas condições abióticas do ensaio. A pré-cultura de microalga pode ser obtida pelo repique a partir da cultura-estoque: <10% de cultura-estoque em 100 mL em meio líquido esterilizado. Ela deve estar em fase exponencial para ser utilizada. No dia do ensaio, conta-se o número de microalgas na pré-cultura e esta é diluída para uma densidade entre 10^3 a 10^4 células/mL, compondo o inóculo, o qual será adicionado nas soluções-teste. No entanto, antes de se fazer o inóculo, a pré-cultura em fase exponencial de crescimento deve ter sua viabilidade medida;

A viabilidade celular é verificada corando uma alíquota da pré-cultura com Vermelho Neutro a uma concentração final de 40 µg/mL. Após incubação por duas horas é feita uma contagem de células (200 células no total) onde células coradas de vermelho são consideradas viáveis e células não coradas são consideradas não viáveis. A cultura é considerada adequada para uso nos testes quando atinge viabilidade > 98%;

Sob as condições acima a pré-cultura é inoculada ao ensaio.

- Ensaio de toxicidade com substância de referência

A sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada realizando um ensaio com substância de referência como: dodecil sulfato de sódio (DSS) ou sulfato de zinco ($Zn SO_4 \cdot 7H_2O$).

O ensaio de sensibilidade a substância referência deve ser realizado conforme as condições do ensaio descritas no Quadro 5.

O valor de toxicidade obtido no ensaio deve estar compreendido em um intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios dos ensaios com substância de referência, com a mesma espécie. Estes dados de sensibilidade atestam a qualidade do lote de organismos a serem usados no ensaio com amostras ambientais.

Os procedimentos realizados no ensaio referência são os mesmos descritos abaixo para ensaios de toxicidade com amostra ambiental (item g), exceto pelas concentrações que irão depender do químico referência utilizado e da alga a ser testada.

Quadro 5. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com algas marinhas.

Requisitos	Condições
Ensaio	Estático
Biomassa inicial	10^3 a 10^4 cel/mL
Água de diluição	Água processada e/ou meio de cultura Guillard f/2
Volume mínimo da solução teste/recipiente	50 mL
Número mínimo de soluções teste ^a	Controle + 5 concentrações para os ensaios com substância de referência, ou Controle Bruto + 5 diluições da amostra ambiental
Número mínimo de réplicas por solução teste	3
Temperatura	23 °C a 27°C
Iluminação	Fotoperíodo 12C:12E, entre 6.000 e 10.000 lux
Velocidade de agitação	100 a 175 rpm
Efeito observado	Inibição da multiplicação das células algáceas
Expressão dos resultados	CENO(I), CEO(I), VC(I), Clp(I) e FT

- Ensaio de toxicidade crônica com amostra ambiental (água e elutriato)

- Preparo para o ensaio - Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental

Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente overnight (aproximadamente 25° C);

- No dia do ensaio preparar o elutriato e as soluções-teste.

➤ Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e meio Guillard f/2 na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de meio que será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio, fazer um volume total de elutriato

de 500 mL. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.

- Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;
- Adicionar meio Guillard f/2 e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes de acordo com o Quadro 6. O procedimento deve ser feito para cada réplica;
- Incubar os recipientes-teste a uma temperatura entre 23 °C a 27 °C, sob luz branca com fotoperíodo de 12C:12E;
- Com o objetivo de manter as células em suspensão, recomenda-se que os recipientes-teste permaneçam em um sistema de agitação constante com velocidade contínua de 100 a 175 rpm.
- O ensaio terá a duração de 72 h \pm 2 h;
- No início e fim do ensaio, analisar os seguintes parâmetros de pelo menos um controle:
 - 1) Medir o pH. Caso haja necessidade, ajustar o pH da solução estoque para que deve ficar em 8,0 \pm 0,2 no início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários;
 - 2) contagem celular ao microscópio ou com contador de células;
 - 3) espectrofotometria, para determinação da densidade celular com leitura da absorbância luminosa em 750 nm.
- No caso de ser utilizado o microscópio, as amostras podem ser preservadas com solução de formol, para posterior determinação do número de células. Utilizar, na preservação de amostras com microalgas formol com concentração final de aproximadamente 4%;
- Amostras coloridas ou turvas podem interferir na determinação da densidade celular por espectrofotometria. Neste caso, preparar uma réplica extra de cada solução-teste, sem algas, para ser utilizada como branco na determinação de sua absorbância.

Quadro 6. Preparo das soluções-teste com águas de amostra ambiental e meio Guillard f/2.

Concentração da solução-teste (%)	Amostra ambiental (mL)	Meio de cultura Guillard f/2 (mL)	Pré-Inóculo (10^3 a 10^4 células/mL)	Volume final (mL)
100	49.0	0	1	50
50	24.0	25	1	50
25	11.5	37.5	1	50
12,5	5.2	43.8	1	50
6,25	2.1	46.9	1	50

Concentração da solução-teste (%)	Amostra ambiental (mL)	Meio de cultura Guillard f/2 (mL)	Pré-Inóculo (10^3 a 10^4 células/mL)	Volume final (mL)
3,12	0.5	48.4	1	50
Controle	0	49	1	50

- Validação dos resultados

O ensaio deve ser considerado válido se:

- a densidade celular do controle estiver 16 vezes maior. A taxa de crescimento das algas, sob as condições especificadas, pode variar entre diferentes espécies;
- o coeficiente de variação das taxas de crescimento do controle não exceder 7 %;
- a variação do pH no controle entre o início e fim do experimento não exceder mais de 1 unidade.

- Expressão dos resultados

- Cálculo da porcentagem de inibição:

Inicialmente, calcular a taxa média de crescimento específico, μ , para cada réplica i , utilizando a Equação 3.

$$\mu = \frac{\ln(N_{tf}) - \ln(N_{ti})}{\Delta t} \times 100$$

Equação 3

Onde:

μ = taxa de crescimento;

N_{ti} = Biomassa no tempo inicial do ensaio;

N_{tf} = Biomassa no tempo final do ensaio;

Δt = diferença entre o tempo final (tf) e tempo inicial (ti).

A biomassa pode ser representada como densidade ótica ou número de células.

- Calculando o percentual de inibição:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\mu_i - \mu_c}{\mu_c} \times 100 \text{ Eq (2)}$$

Onde:

μ_i = Taxa específica de crescimento para cada tratamento;

μ_c = Taxa específica de crescimento para o controle.

d) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 04: Manutenção e ensaio de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia spp*

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização de ensaios para a determinação da toxicidade crônica de amostras líquidas para *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera).

A base deste documento é a Norma Técnica ABNT NBR 13373, de 28 de março de 2017, que avalia a toxicidade crônica de amostras líquidas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água, para *Ceriodaphnia spp*. Como princípio do teste, indivíduos neonatos de *Ceriodaphnia spp* com menos de 24 h são expostos a diferentes concentrações da substância-teste, por um período de 7 dias. Os indivíduos são verificados quanto a sua sobrevivência ou número total de descendentes vivos produzidos.

- Material e equipamentos

- Medidor de oxigênio
- Medidor de pH
- Termômetro de máxima e mínima
- Equipamento/material para demanda química de oxigênio (DQO)
- Equipamento/material para determinação da dureza da água
- Incubadora com temperatura e fotoperíodo controlados
- Caixa de luz
- Copos béquer de vidro – 100 mL
- Pisseta para colocar água de diluição
- - Material biológico

Os organismos-teste são neonatos da espécie *Ceriodaphnia dubia*, com idade de aproximadamente 6 a 24 h, obtidos por partenogênese a partir de fêmeas adultas com idade entre 7 dias e 21 dias.

- Soluções

- Água para diluição e manutenção: água natural da torneira filtrada (malha 60 e 80 μm) e decolorada (aerada por 48 h) ou meio de cultivo;

- Solução de KCl 0,5M;
- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência;
- Elutriato: solução aquosa obtida após adição de água de diluição a uma amostra sólida (na proporção de 1 parte de sedimento para 4 partes de água de diluição) submetida à agitação e posterior decantação ou, quando necessário, centrifugação ou filtração.

- Cultivo

- Condições de uso do material de cultivo

Qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser feito de vidro ou outro material quimicamente inerte.

O material deve ser lavado antes do uso, de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01.

Os recipientes lavados devem ser tampados para evitar a entrada de poeira.

- Montagem do cultivo

- O cultivo deve ser mantido em béqueres de 2 L. Cada cultivo deve possuir identificação: número do cultivo, data de início do cultivo e nome do responsável pelo cultivo;
- Para fazer o cultivo, separar com pipeta pasteur plástica 70 neonatos de *Ceriodaphnia* spp e acondicionar num béquer de 2 L contendo 1 L de água de clorada e filtrada;
- A manutenção do cultivo deve ser feita com troca total da água, 2 vezes por semana;
- Na troca, os indivíduos adultos devem ser transferidos um a um com ajuda de pipeta plástica e lupa para um béquer com água de clorada limpa. Deve ser registrado o número de indivíduos vivos e mortos no momento da troca;
- Durante a manutenção, caso os neonatos sejam usados para teste ou para novos cultivos, estes devem ser contados e o número registrado; caso não sejam usados, a água restante no béquer de cultivo contendo os neonatos deve ser filtrada em filtro de 45 µm e jogada na pia. Os neonatos que permaneceram na malha devem ser mergulhados em hipoclorito para posterior descarte;
- No caso do aparecimento de efípios (ovos de resistência), estes devem ser acondicionados em frasco contendo hipoclorito e não podem ser descartados. Devem ficar armazenados;
- O procedimento de abertura de novos cultivos deve ser repetido a cada 7 dias e cultivos com mais de 21 dias devem ser descartados;
- A primeira prole de cada cultivo deve ser registrada quanto a sua data, pois recomenda-se usar apenas a partir da 2ª prole de um cultivo para os ensaios.

- Alimentação

- Várias espécies de algas verdes unicelulares podem ser utilizadas para alimentação de Ceriodaphnia spp como, por exemplo, a Pediastrum boryanum. As algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento. No caso a P. boryanum é cultivada em meio WC com aeração;
- Os cultivos devem receber alimentação diariamente, evitando-se deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação;
- A quantidade fornecida de alga deve ser de 1×10^6 células por organismo.
- Ensaio de toxicidade com substância de referência
- Verificar se o número de neonatos obtidos do cultivo é suficiente para realização do ensaio;
- O ensaio com substância de referência é realizado em água de diluição;
- A substância referência indicada é o NaCl;
- No caso de se usar o NaCl como substância referência, considerar a seguinte faixa de concentração: 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 g/L de NaCl. Os Quadro 7 e Quadro 8 mostram o cálculo para solução-estoque a partir do NaCl e exemplo de preparo de soluções-teste, respectivamente.

Quadro 7. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência.

Reagente	Quantidade (g)	Preparo
NaCl Para solução de 10 g/L	5 g	Dissolver em água de diluição e aferir o volume em balão volumétrico para 500 mL

Fazer a solução previamente a cada ensaio.

Quadro 8. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referencia

Solução-teste (g/L)	Volume de solução-trabalho de 10 g/L de NaCl (mL)	Volume de água de diluição (mL)	Volume final para as 10 réplicas do teste (150) + Extra (50) (mL)
Controle	0	200	200
0,25	5	195	200
0,5	10	190	200
1,0	20	180	200
2,0	40	160	200
4,0	80	120	200

- O preparo das soluções-teste deve ser feito no dia do ensaio. Os recipientes devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;

- Medir o oxigênio dissolvido (OD), dureza, condutividade e pH das soluções, inicialmente. Depois dividir as soluções em béqueres de 100 mL (cada recipiente-teste deve ser preenchido com 15 mL de solução);
- Colocar os organismos, sendo 1 organismo por recipiente-teste;
- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado com 10 organismos expostos um a um, na proporção de 1 organismo / 15 mL de água de diluição: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 60 béqueres (ver Quadro 8);
- Para o início do ensaio, neonatos de *Ceriodaphnia dubia*, entre 6 e 24 h de vida devem ser triados e adicionadas nos béqueres (fazer a triagem com auxílio de caixa de luz e lupa);
- Por fim, tampa-se os béqueres com filme plástico furado com agulha fina ou placa de petri;
- O teste tem duração de 7 dias e as condições abióticas são: 12C:12E e temperatura 24°C ± 2°C, e sem aeração;
- A letalidade dos organismos adultos no controle não deve ser superior ou igual a 20 %. O número médio de neonatos produzidos por fêmea no controle deve ser igual ou maior que 15; Quadro 9 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;
- Ao fim do ensaio (7 dias de exposição), triar os organismos usando pipeta de plástico e verificar movimento. Os animais são considerados mortos quando não há movimentação espontânea ou reação aos estímulos táteis usando ponteira fina (pipeta pasteur de vidro, por exemplo). Além disso, conta-se o número fêmeas, mesmo mortas, e o número de neonatos. O número médio de neonatos produzidos em cada solução-teste é comparado com o número médio obtido no controle;
- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura e condutividade;
- Descartar a solução que contenha NaCl na pia;
- Deixar os organismos de molho no hipoclorito antes de descartar na pia;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 9. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Béqueres de 100 mL
Ensaio	Semiestático – troca de meio total com intervalo de 2 a 3 dias entre as trocas
Duração do ensaio	7 dias
Organismo-teste	<i>Ceriodaphnia dubia</i> - neonatos de 6 a 24 h

Requisitos	Condições
Meio do ensaio	Água filtrada e dechlorada
Substância referência	NaCl
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referência ou + 6 concentrações da amostra ambiental
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por béquer	15 mL - 1 organismo por recipiente
Número de Réplicas	10 réplicas para cada tratamento
Número de organismos por réplica	1
Alimentação	Alimentar com algas logo após a troca de meio
Temperatura	24°C ± 2 °C
Fotoperíodo	12 h C: 12 h E
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água de diluição	pH entre 7,0 e 7,6, dureza total entre 40 e 48 mg CaCO ₃ /L, e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L
Efeito observado	Sobrevivência ou reprodução
Expressão do resultado	Para substância referência: CL ₅₀ ou CI ₅₀ (concentração mediana que causa mortalidade ou inibição na reprodução em 50 % dos organismos) Para amostra ambiental: CL ₅₀ ou CI ₅₀ ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle (Fator de Toxicidade (FT), valor crônico (VC), CEO, CENO, CEp (concentração que causa efeito para determinada porcentagem de organismos-teste em relação ao controle) ou tóxico e não tóxico).

➤ Ensaio de toxicidade crônica com amostra ambiental (água e elutriato) verificar se a quantidade de neonatos é suficiente para a realização do ensaio. Isso deve ser feito ao fim do dia, após separar as fêmeas pela manhã.

→ Preparo para o ensaio:

Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental, descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente over night (aproximadamente 25° C);

No dia do ensaio, preparar o elutriato e as soluções teste.

➤ Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e água mineral na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio o volume total de elutriato é de 500 mL. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.

- Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;
- Adicionar água de diluição e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes de acordo com o Quadro 8. Distribuir o volume total de 200 mL em 10 béqueres, de forma que cada béquer contenha 15 mL;
- O ensaio deve ser mantido à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12C:12E;
- O Quadro 10 traz informações sobre o preparo das soluções com amostra ambiental e o Quadro 9 traz as condições do ensaio;
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), condutividade, temperatura e pH da solução-teste inicial. Caso haja necessidade de ajustar o pH para início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários. O pH não deve ser ajustado durante o ensaio;
- Adicionar 1 organismo (neonatos de 6 a 24 h) em cada recipiente-teste, um a um, usando pipeta plástica;
- O ensaio deve ser encerrado após 7 dias;
- Ao fim do ensaio, triar os organismos com auxílio de pipeta plástica, observando imobilidade à estímulos táteis, os organismos imóveis devem ser considerados como mortos. Além disso, contar o número fêmeas, mesmo mortas, e o número de neonatos. O número médio de neonatos produzidos em cada solução-teste é comparado com o número médio obtido no controle;
- Para validação dos resultados a letalidade dos organismos adultos no controle não deve ser superior ou igual a 20 %. O número médio de neonatos produzidos por fêmea no controle deve ser igual ou maior que 15;
- Determinar o oxigênio dissolvido, o pH e a condutividade da água dos recipientes-teste em 1 das réplicas, após retirar os organismos. A concentração final de oxigênio dissolvido (OD) deve ser ≥ 3 mg/L em todos os tratamentos, incluindo os grupos controle, e o pH não deve estar fora da faixa de 5,0 a 9,0;
- Deixar os organismos de molho no hipoclorito antes de descartar na pia;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 10. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriado de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (mL)	Água de diluição - dechlorada (mL)	Volume final (mL) para as 10 réplicas do teste (150 mL) + Extra (50 mL)
100	200	-	200
50	100	100	200
25	50	150	200
12,5	25	175	200
6,2	12,5	187,5	200
3,1	6,2	193,8	200

e) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 05: Manutenção e ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

• Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização do cultivo e ensaios para a determinação da toxicidade aguda de amostras líquidas utilizando como modelo *Daphnia magna* Straus 1820 (Crustacea, Cladocera). A base deste documento é a Norma Técnica ABNT NBR 12713, quarta edição, de 19 de maio de 2016.

Como princípio do teste, neonatos de *Daphnia magna*, entre 2 e 26 h de vida, são expostos a diferentes concentrações da substância-teste, e os indivíduos são verificados quanto a sua imobilização após 24 e/ou 48 h de exposição. Os resultados são comparados a um grupo controle.

• Material e equipamentos

- Medidor de oxigênio;
- Medidor de pH;
- Termômetro de máxima e mínima;
- Equipamento/material para demanda química de oxigênio (DQO);
- Equipamento/material para determinação da dureza da água;
- Incubadora com temperatura e fotoperíodo controlados;
- Caixa de luz;
- Copos béquer de vidro – 50 mL;
- Pipetas 5mL com ponteira de boca larga (cortar a ponta da ponteira);
- Solução-teste;

➤ Pisseta para colocar água de diluição.

- - Material biológico

Os organismos-teste são neonatos (2 a 26 h) de *Daphnia magna* (Figura 1 e Figura 2) obtidos por partenogênese a partir da segunda postura por fêmeas com idade entre 10 e 60 dias.

Figura 1. *Daphnia magna*



Figura 2. a) *Daphnia* spp com efípio; b) efípios liberados.



- Soluções

➤ Água para diluição e manutenção: água mineral ou meio de cultivo;

➤ Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência;

➤ Elutriato: solução aquosa obtida após adição de água de diluição a uma amostra sólida (na proporção de 1 parte de sedimento: 4 partes de água de diluição) submetida à agitação e posterior decantação ou, quando necessário, centrifugação ou filtração.

- Cultivo

- Condições de uso do material de cultivo

Qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser feito de vidro ou outro material quimicamente inerte;

O material deve ser lavado antes do uso, de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01;

Os recipientes lavados devem ser tampados para evitar a entrada de poeira.

➤ Montagem do cultivo:

→ O cultivo deve ser mantido em béqueres de 2 L. Cada cultivo deve possuir identificação: número do cultivo, data de início do cultivo e nome do responsável pelo cultivo;

→ Para fazer o cultivo, separar com pipeta pasteur plástica 50 neonatos de *Daphnia* spp e acondicionar num béquer de 2 L contendo 1,5 L de água mineral;

→ A manutenção do cultivo deve ser feita com troca total da água, 2 vezes por semana;

→ Na troca, os indivíduos adultos devem ser transferidos um a um com ajuda de pipeta plástica com a ponta cortada para um béquer com água mineral limpa. Deve ser registrado o número de indivíduos vivos e mortos no momento da troca;

→ Durante a manutenção, caso os neonatos sejam usados para teste ou para novos cultivos, estes devem ser contados e o número registrado; caso não sejam usados, a água restante no béquer de cultivo contendo os neonatos deve ser filtrada em filtro de 45 µm e jogada na pia. Os neonatos que permaneceram na malha devem ser mergulhados em hipoclorito para posterior descarte;

→ No caso do aparecimento de efípios (ovos de resistência), estes devem ser acondicionados em frasco contendo hipoclorito e não podem ser descartados. Devem ficar armazenados;

→ O procedimento de abertura de novos cultivos deve ser repetido a cada 15 dias e cultivos com mais de 60 dias devem ser descartados;

→ A primeira prole de cada cultivo deve ser registrada quanto a sua data, pois recomenda-se usar apenas a partir da 2ª prole de um cultivo para os ensaios.

➤ Alimentação:

→ Várias espécies de algas verdes unicelulares podem ser utilizadas para alimentação de *Daphnia* spp como, por exemplo, a *Pediastrum boryanum*. As algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento. No caso a *P. boryanum* é cultivada em meio WC com aeração;

- Os cultivos devem receber alimentação diariamente, evitando-se deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação;
- A quantidade fornecida de alga deve ser de 1×10^6 células por Daphnia.
- Ensaio de toxicidade com substância de referência

Verificar se o número de neonatos obtidos dos cultivos é suficiente para realização do ensaio;

O ensaio com substância de referência é realizado em água de diluição;

A substância referência indicada é o NaCl;

No caso de se usar o NaCl como substância referência, considerar a seguinte faixa de concentração: 4,0, 4,8, 5,6, 6,4 e 7,2 g/L de NaCl. Os Quadro 11 e Quadro 12 mostram o cálculo para solução-estoque a partir do NaCl e exemplo de preparo de soluções-teste, respectivamente.

Quadro 11. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência.

Reagente	Quantidade (g)	Preparo
NaCl Para solução de 10 g/L	5 g	Dissolver em água de diluição e aferir o volume em balão volumétrico para 500 mL

Fazer a solução previamente a cada ensaio.

Quadro 12. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência.

Solução-teste (g/L)	Volume de solução-trabalho de 10 g/L de NaCl (mL)	Volume de água de diluição (mL)	Volume final para as 2 réplicas do teste (40 mL) + Extra (10 mL)
Controle	-	50	50
4,0	20	30	50
4,8	24	26	50
5,6	28	22	50
6,4	32	18	50
7,2	36	14	50

- O preparo das soluções-teste deve ser feito no dia do ensaio. Os recipientes devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), temperatura, dureza, condutividade e pH das soluções, inicialmente, antes de colocar os organismos. Depois dividir as soluções em béqueres de 50 mL (cada recipiente-teste deve ser preenchido com 20 mL de solução);
- Colocar os organismos nos béqueres com auxílio de pipeta de plástico, sendo 1 organismo por recipiente-teste;

- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado, em duplicata, com 10 animais por frasco, contendo 2 mL de água por organismo: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 12 béqueres;
- Para o início dos ensaios, neonatos de *Daphnia magna* entre 2 e 26 h de vida devem ser triados e adicionadas nos béqueres um a um (fazer a triagem com auxílio de caixa de luz e lupa), em um n de 10 organismos por béquer;
- Por fim, tampa-se os béqueres com filme plástico furado com agulha fina ou placa de petri;
- O teste tem duração de 48 h e as condições abióticas são: 12C: 12E e temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e sem aeração;
- No grupo controle, a imobilização dos daphnideos não deve ultrapassar 10%;
- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura e condutividade;
- O Quadro 13 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;
- Ao fim do ensaio (48 h de exposição), triar os organismos e verificar movimento. Os animais são considerados mortos quando não há movimentação espontânea ou reação à estímulos táteis usando ponteira fina (pipeta pasteur de vidro, por exemplo);
- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), salinidade inicial, pH, temperatura e condutividade;
- Descartar a solução que contenha NaCl na pia;
- Deixar os organismos de molho no hipoclorito antes de descartar na pia;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 13. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Béqueres de 50 mL
Ensaio	Estático
Duração do ensaio	96 horas
Organismo-teste	<i>Daphnia magna</i> - neonatos de 2 a 26 h
Meio do ensaio	Água mineral
Substância referência	NaCl
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referência ou + 6 concentrações da amostra ambiental
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por béquer	20 mL (2 mL/organismo)

Requisitos	Condições
Número de Réplicas	2 réplicas de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	Sem alimentação – evitar iniciar ensaios às segundas-feiras, pois no fim de semana os animais não são alimentados
Temperatura	20°C ± 2 °C
Fotoperíodo	12 h C: 12 h E
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	pH entre 7,0 e 7,6, dureza total entre 125 a 225 mg CaCO ₃ /L. condutividade entre 190 a 250 µS/cm e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L
Efeito observado	Imobilidade (sobrevivência)
Expressão do resultado	Para substância referência: CE ₅₀ (concentração mediana que causa imobilidade em 50 % dos neonatos) Para amostra ambiental: CE ₅₀ ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle (Fator de Toxicidade (FT), ou tóxico e não tóxico

- Ensaio de toxicidade aguda com amostra ambiental (água e elutriato)

Verificar se a quantidade de neonatos é suficiente para a realização do ensaio. Isso deve ser feito ao fim do dia, após separar as fêmeas pela manhã.

Preparo para o ensaio - Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental

➤ Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente overnight (aproximadamente 25o C);

No dia do ensaio preparar o elutriato e as soluções-teste.

➤ Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e água mineral na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio, fazer um volume total de elutriato de 200 mL. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.

➤ Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;

➤ Adicionar água de diluição e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes. Distribuir o volume total de 50 mL em 2 béqueres, de forma que cada béquer contenha 20 mL;

- O ensaio deve iniciar somente com as soluções em temperatura de 20o C;
- O Quadro 14 traz informações sobre o preparo das soluções com amostra ambiental;
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), condutividade, temperatura e pH da solução-teste inicial. Caso haja necessidade de ajustar o pH para início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários. O pH não deve ser ajustado durante o ensaio;
- Adicionar 10 organismos (neonatos de 2 a 26 h) em cada recipiente-teste, um a um, com auxílio de pipeta plástica;
- O ensaio deve ser encerrado após 48 h;
- Ao fim do ensaio, triar os organismos e observar imobilidade. No grupo controle, a imobilização dos daphnídeos não deve ultrapassar 10% para que o ensaio seja validado;
- Determinar o oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH e a condutividade da água dos recipientes-teste, ao final do ensaio, após retirar os organismos. A concentração final de oxigênio dissolvido (OD) deve ser ≥ 3 mg/L em todos os tratamentos, incluindo os grupos controle;
- Contar e registrar somente os organismos vivos e relativizar pelo total de organismos expostos;
- Deixar os organismos de molho no hipoclorito antes de descartar na pia;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 14. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriado de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (mL)	Água de diluição - mineral (mL)	Volume final (mL) para as 2 réplicas do teste (40 mL) + Extra (10 mL)
100	50	-	50
50	25	25	50
25	12,5	37,5	50
12,5	6,2	43,8	50
6,2	3,1	46,9	50
3,1	1,5	48,5	50

f) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 06: Manutenção e ensaio ecotoxicológico com embrião de *Danio rerio* (FET TEST)

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para ensaios para a determinação da toxicidade aguda de amostras líquidas utilizando como modelo embriões do peixe Danio rerio (zebrafish). A base deste documento é a Norma Técnica OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 236 – Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.

Como princípio do teste, ovos de Danio rerio são expostas a diferentes concentrações da substância-teste, por um período de 96 h. Os ovos são verificados a cada 24 h e indicadores de inviabilidade são anotados, como: 1) coagulação de ovos fertilizados; 2) falta ou mal formação de somito; 3) ausência de deslocamento da cauda do saco vitelínico; 4) ausência de batimento cardíaco. Ao final do ensaio (96 h), a toxicidade aguda é determinada baseada na observação de qualquer uma das 4 observações e o valor de toxicidade é calculado.

- Material e equipamentos:

- estereomicroscópio binocular com uma ampliação de pelo menos 80x;
- lacas padrão de 24 poços com uma profundidade de aprox. 20 mm;
- incubadora ou ambiente climatizado com fotoperíodo e temperatura controlados;
- armadilha contando bandeja, rede para proteção de ovos e substrato artificial;
- pipetas com aberturas ampliadas para coleta de ovos;
- recipientes de vidro para recolher os ovos e preparar diferentes concentrações de ensaio e água de diluição (béqueres de 50 ml e 100 ml, proveta de 100ml);
- pipeta automática (1 ml);
- pipeta pasteur de plástico;

- Material biológico:

- Os organismos-teste são ovos de Danio rerio (zebrafish), obtidas de desovas do sistema de cultivo do Biotério Aquático do ICB – FURG.

- Soluções

- Água para diluição e manutenção: água da torneira filtrada e declorada com aeração por, no mínimo 48 h. A água de diluição está disponível do Biotério Aquático do ICB-FURG, pois faz parte da rotina deste biotério aerar água para os cultivos. Esta água é usada para a manutenção dos reprodutores e para diluição das soluções-teste. A condição da água de diluição é descrita no

Quadro 15;

- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência.

Quadro 15. Parâmetros da água para manutenção dos reprodutores e diluição das amostras e substâncias de referência.

Parâmetro	Condições
Água	Declorada da rede de abastecimento
pH	6,5 a 8,5
Temperatura	23 a 27°C
OD	> 5 mg/L
Dureza	10 a 60 mg CaCO ₃ /L
Alcalinidade	15 a 250 mg CaCO ₃ /L
Amônia	< 0,05 mg/L NH ₄ ⁺
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz com luminosidade difusa
Relação massa / volume	1 g de peixe por litro de água de cultivo

- Obtenção dos ovos

- Os ovos são obtidos através do cruzamento de adultos de Danio rerio, com a liberação de gametas na água (fecundação externa), mantidos em sistema de cultivo;
- É importante salientar que qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser lavado antes do uso de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01.

- Desova

- Para a obtenção dos ovos, as condições de alimentação e qualidade da água em biotério devem ser mantidas constantes, ver POP para manutenção e ensaio de toxicidade aguda com adultos Danio rerio;
- Realizar a sexagem de Danio rerio, separando machos e fêmeas e mantendo as fêmeas em tanque separado por até 3 dias antes da montagem dos tanques de reprodução;
- Após montar caixas de reprodução no sistema, com uma proporção de 2 machos para 1 fêmea, respeitando a densidade de 1g de animal por litro de água. Devem ser colocados, no mínimo, 12 machos e 6 fêmeas para uma boa desova, ou seja, para que a desova seja suficiente para obtenção do número de larvas necessário para o ensaio. Os animais podem ser distribuídos em diferentes aquários. Fazer 2 ou 3 desovas prévias às dos ensaios para conferir se os reprodutores estão apresentando alta taxa de reprodução;
- Para evitar viés genético, os ovos são, de preferência, coletados de no mínimo três grupos de reprodutores, misturados e selecionados aleatoriamente;
- Ao final da tarde (17-19h) inserir o aparato artesanal de retenção de ovos (bandeja, rede e substrato artificial) nos aquários de reprodução;

- Na manhã seguinte, monitorar o aparato a partir de uma hora após acender a luz do biotério, e ao visualizar a desova, retirar a mesma;
- Passar o conteúdo do aparato em um coador e posteriormente, lavar o mesmo com água do sistema para um béquer limpo;
- Com auxílio de pipeta pasteur, limpar os ovos delicadamente, retirando resíduos de ração, bem como ovos já fungados que possam estar presentes junto a desova;
- Estimar o número de ovos e anotar na planilha de controle de desovas do biotério;
- Os ovos inviáveis devem ser separados e descartados. Os ovos viáveis (embriões) devem ser utilizados imediatamente nos ensaios. Deve-se fazer a proporção entre ovos viáveis e inviáveis e o número de ovos fertilizados na desova tem que ser superior à 70 % para que os ovos possam ser usados;
- Os embriões devem ser imersos nas soluções de teste antes do início da clivagem do blastocisto ou, no máximo, no estágio de 16 células, até 90 minutos pós-fertilização.

- Ensaio de toxicidade

Preparo para o ensaio: no dia anterior ao ensaio com amostra ambiental descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente over night (aproximadamente 25° C).

No dia do ensaio, para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e água de diluição na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Fazer um volume total de elutriato de 350 mL. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.

- Ensaio

→ Nomear as placas de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato, bem como controle negativo e controle positivo. É usada 1 placa por concentração de amostra ambiental + 1 placa para controle negativo + 1 placa para controle positivo. Além disso, haverá um controle negativo em todas as placas;

→ Adicionar água de diluição e amostra ambiental (água ou elutriato) em béqueres. Fazer 120 mL de cada solução-teste e medir os parâmetros físico-químicos. Caso haja necessidade de ajustar o pH para início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários;

→ Adicionar 2,5 a 5 mL de cada solução-teste à cada poço, preenchendo 20 poços de cada placa com o mesmo tratamento (ver Quadro 16). Os 4 poços restantes de cada placa devem ser preenchidos com apenas água de diluição (controle negativo da placa).

- A placa destinada para controle positivo, deve ter 20 poços preenchidos com 2,5 a 5 mL de acetona na concentração de 0,1 % ou 4,0 mg/L de dicloroanilina. Para que o ensaio seja validado, no controle positivo deve ser observada uma mortalidade de 30 % ao final das 96 h de exposição. Os 4 últimos poços também devem conter somente água de diluição (controle negativo da placa), assim como nas placas com as soluções-teste;
- A placa com o controle negativo é totalmente preenchida com água de diluição (controle do ensaio). A viabilidade dos ovos deve ser superior ou igual a 90 % ao fim das 96 h;
- Portanto, para 1 ensaio são usadas 8 placas;
- Adicionar um ovo fecundado em cada poço;
- Observar em estereomicroscópio a condição do ovo a cada 24 h. Os ovos que apresentarem as seguintes alterações: 1) coagulação de ovos fertilizados; 2) falta ou mal formação de somito; 3) ausência de deslocamento da cauda do saco vitelínico; 4) ausência de batimento cardíaco, são considerados como não viáveis. Exemplos ilustrados da montagem da placa, montagem do ensaio, as etapas normais do desenvolvimento embrionário de zebrafish e as condições patológicas mencionadas acima, podem ser consultados na Norma da OECD 236, na qual este POP está baseado;
- Ao fim do ensaio, os ovos viáveis devem ser eutanasiados por congelamento e estocados em freezer para descarte apropriado;
- Depois de retirar os ovos, medir novamente o OD no controle. Este deve ser superior ou igual a 80 % de saturação. Este é outro quesito para validação do ensaio;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio;

O

Quadro 17 apresenta um compilado das condições do ensaio.

Quadro 16. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriado de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (mL)	Água de diluição (mL)	Volume final (mL) para as 20 poços + Extra (20 mL)
100	120	-	120
50	60	60	120
25	30	90	120
12,5	20	100	120
6,2	15	105	120
3,1	12	108	120

Quadro 17. Resumo dos requisitos para o ensaio.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Placas de 24 poças
Ensaio	Estático
Duração do ensaio	96 horas com observação a cada 24 h
Organismo-teste	<i>Danio rerio</i> – embriões
Meio do ensaio	Água da torneira filtrada e decolorada
Substância referência	Aceona 0,1% ou dicloroanilina 4,0 mg/L – controle positivo
Tratamentos	1 placa por concentração de amostra ambiental + 1 placa para controle negativo + 1 placa para controle positivo
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por aquário	2,5 a 5 mL por poça
Número de Réplicas	1 placa por tratamento
Número de organismos por réplica	1 organismo por poço
Alimentação	Sem alimentação
Temperatura	26°C ± 1 °C
Fotoperíodo	14 h C: 10 h E
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	Ver Quadro 15
Efeito observado	Inviabilidade dos ovos resultante das seguintes alterações: 1) coagulação de ovos fertilizados 2) falta ou mal formação de somito 3) ausência ou deslocamento do saco vitelínico 4) ausência de batimento cardíaco
Expressão do resultado	CE ₅₀ (concentração mediana que causa efeito em 50 % dos organismos) ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle (Fator de Toxicidade (FT), ou tóxico e não tóxico).

g) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 07: Manutenção e ensaio ecotoxicológico com larvas de *Danio rerio*

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para ensaios para a determinação da toxicidade crônica de amostras líquidas utilizando como modelo larvas do peixe

Danio rerio (zebrafish). A base deste documento é a Norma Técnica ABNT NBR 15499, terceira edição, de 08 de abril de 2016.

Como princípio do teste, larvas de *Danio rerio* são expostas a diferentes concentrações da substância-teste, por um período de 7 dias. Os indivíduos são verificados quanto a sua sobrevivência ao final do teste, e comparados ao grupo controle.

- Material e equipamentos

- ração comercial de peixe;
- sistema de aquários com recirculação de água;
- incubadora ou ambiente climatizado com fotoperíodo e temperatura controlados ;
- balança analítica;
- estereomicroscópio;
- balão volumétrico;
- béqueres de volumes variados;
- bastão de vidro para mistura de solução;
- medidor de condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e pH;
- pipeta graduada;
- proveta;
- recipiente-teste de vidro;
- rede para manipular o organismo-teste;
- termômetro.

- Material biológico

- Os organismos-teste são larvas de *Danio rerio* (zebrafish), obtidas de desovas do sistema de cultivo do Biotério Aquático do ICB – FURG.

- Soluções

- Água para diluição e manutenção: água da torneira filtrada e declorada com aeração por, no mínimo 48 h. A água de diluição está disponível do Biotério Aquático do ICB-FURG, pois faz parte da rotina deste biotério aerar água para os cultivos;

- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência.

- Obtenção das larvas

- As larvas são obtidas através do cruzamento de adultos de Danio rerio, com a liberação de gametas na água (fecundação externa), mantidos em sistema de cultivo;
- É importante salientar que qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser lavado antes do uso de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01.

- Desova

- Para a obtenção dos ovos, as condições de alimentação e qualidade da água em biotério devem ser mantidas constantes, ver POP para manutenção e ensaio de toxicidade aguda com adultos Danio rerio;
- Realizar a sexagem de Danio rerio, separando machos e fêmeas e mantendo as fêmeas em tanque separado por até 3 dias antes da montagem dos tanques de reprodução;
- Após, montar caixas de reprodução no sistema, com uma proporção de 2 machos para 1 fêmea, respeitando a densidade de 1g de animal por litro de água. Devem ser colocados, no mínimo, 12 machos e 6 fêmeas para uma boa desova, ou seja, para que a desova seja suficiente para obtenção do número de larvas necessário para o ensaio. Os animais podem ser distribuídos em diferentes aquários;
- Para evitar viés genético, os ovos são, de preferência, coletados de no mínimo três grupos de reprodutores, misturados e selecionados aleatoriamente;
- Ao final da tarde (17-19h) inserir o aparato artesanal de retenção de ovos (bandeja, rede e substrato artificial) nos aquários de reprodução;
- Na manhã seguinte, monitorar o aparato a partir de uma hora após acender a luz do biotério, e ao visualizar a desova, retirar a mesma;
- Passar o conteúdo do aparato em um coador e posteriormente, lavar o mesmo com água do sistema para um béquer limpo;
- Com auxílio de pipeta pasteur, limpar os ovos delicadamente, retirando resíduos de ração, bem como ovos já fungados que possam estar presentes junto a desova;
- Passar ovos limpos para meio M3 previamente feito (Quadro 18);
- Estimar o número de ovos e anotar na planilha de controle de desovas do biotério;
- Monitorar constantemente a desova, para a retirada de ovos fungados. Esse procedimento é muito importante visto que a presença do fungo se alastra rapidamente. Nas primeiras 6 horas após retirada do aparato, monitorar a desova de 2 em 2 horas. Após o monitoramento de ovos pode ser realizado no mínimo 3 vezes ao dia, até a eclosão, com uso de estereomicroscópio para avaliar se

estão em bom desenvolvimento. O guia da OECD 236 pode ser usado como base para o critério de bom desenvolvimento embrionários e traz ilustrações;

- De 72 a 96 h, os ovos iniciam e eclosão em larvas. Devem ser utilizadas para o ensaio crônico larvas com até 24 h de eclosão.

Quadro 18. Preparo do meio M3. Preparar 1 L e armazenar em geladeira.

Reagente	Concentração (mM)	Pesar (mg) e adicionar em 1 L de água de diluição
NaCl	13,7	58,5
KCl	0,54	75,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0	246,47
CaCl ₂	1,3	111,0
Na ₂ HPO ₄	0,025	141,96
KH ₂ PO ₄	0,044	136,0
NaHCO ₃	4,2	84,0

- - Ensaio de toxicidade com substância de referência
 - Iniciar o ensaio com substância de referência apenas se o número de ovos em desenvolvimento para obtenção de larvas for suficiente para preencher o número de organismos necessários para o ensaio;
 - O ensaio com substância de referência é realizado em água de diluição. As condições da água de diluição encontram-se no Quadro 19;
 - A substância referência indicada é o NaCl;
 - No caso de se usar o NaCl como substância referência, considerar a seguinte faixa de concentração: 1, 2, 4, 8 e 16 g/L de NaCl;
 - Quadro 20 mostra o preparo das soluções-teste. NaCl é diretamente dissolvido na água de diluição num volume suficiente para todas as réplicas (1,2 L de volume total para preencher 4 béqueres com 250 mL de meio), sob agitação com agitador magnético e colocado nos aquários de experimentação.

Quadro 19. Parâmetros da água para manutenção dos reprodutores e diluição das amostras e substâncias de referência.

Parâmetro	Condições
Água	Declorada da rede de abastecimento
pH	6,5 a 7,5
Temperatura	23 a 27°C
OD	> 5 mg/L
Dureza	10 a 60 mg CaCO ₃ /L
Alcalinidade	15 a 250 mg CaCO ₃ /L

Parâmetro	Condições
Amônia	< 0,05 mg/L NH ₄ ⁺
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz com luminosidade difusa
Relação massa / volume	1 g de peixe por litro de água de cultivo

Quadro 20. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência.

Solução-teste (g/L)	Quantidade de NaCl (g) para 1,2 L de água de diluição
Controle	-
1	1,2
2	2,4
4	4,8
8	9,6
16	19,2

- O preparo das soluções-teste deve ser feito no dia do ensaio. Os recipientes devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), temperatura, dureza, condutividade e pH das soluções, inicialmente, antes de colocar os organismos e antes de distribuir o volume final de solução nos béqueres (recipientes experimentais);
- Colocar as larvas nos recipientes experimentais com auxílio de puçá, uma a uma;
- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado, em quadruplicata, com 10 animais por réplica em recipiente com 250 mL: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 24 recipientes-teste (ver Quadro 21);
- Não há necessidade de aeração;
- O teste tem duração de 7 dias ou 168 horas e as condições abióticas são: 14C: 10E e temperatura 24°C ± 2 °C;
- Avaliar a mortalidade das larvas (imobilidade à estímulos táteis) ao longo do teste e remover as mortas;
- No grupo controle, a mortalidade dos peixes não deve ultrapassar 20%;
- Os organismos que sobreviveram ao fim do ensaio devem ser eutanasiados por congelamento em nitrogênio líquido ou em freezer -80o C;
- Descartar os organismos em freezer para recolhimento por empresa competente;

- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), dureza, pH, temperatura e condutividade;
- A Quadro 21 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 21. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Béqueres de 500 mL
Ensaio	Semiestático com renovação total de meio no 3º e 5 dia de ensaio. No 2º e 4º dia de ensaio deve-se realizar os processos de descongelamento de água e sedimento para produção do elutriato conforme item 6.1, para que o meio seja renovado
Duração do ensaio	7 dias
Requisitos	Condições
Organismo-teste	<i>Danio rerio</i> - larvas
Meio do ensaio	Água da torneira filtrada e dechlorada
Substância referência	NaCl
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referência (ver Quadro 3) ou + 6 concentrações da amostra ambiental (ver Quadro 5)
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por aquário	250 mL
Número de Réplicas	4 réplicas de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	Sem alimentação
Temperatura	24°C ± 2 °C
Fotoperíodo	14 h C: 10 h E
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	Ver Quadro 19
Efeito observado	Mortalidade
Expressão do resultado	Para substância referência: CL ₅₀ (concentração mediana que causa mortalidade em 50 % dos organismos) Para amostra ambiental: CL ₅₀ ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle (Fator de Toxicidade (FT), ou tóxico e não tóxico).

- Ensaio de toxicidade crônica com amostra ambiental (água e elutriato)

Preparo para o ensaio

Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental

- Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente overnight (aproximadamente 25° C).

No dia do ensaio

- Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e água de diluição na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada renovação de meio, fazer um volume total de elutriato de 2,5 L. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.
- Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;
- Adicionar água de diluição e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes;
- O ensaio deve iniciar somente com as soluções em temperatura de 24o C.

Ensaio

O Quadro 22 traz as condições do ensaio.

- Medir o oxigênio dissolvido (OD), dureza, condutividade, temperatura e pH da solução-teste inicial, antes de dividir o volume total feito de cada solução nos 4 recipientes-teste (cada um compreenderá volume de 250 mL). Caso haja necessidade de ajustar o pH para início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários. O pH não deve ser ajustado durante o ensaio;
- Adicionar 10 larvas em cada recipiente-teste, um a um, com auxílio de pipeta de pasteur de plástico com a ponta cortada;
- O ensaio deve ser encerrado após 7 dias;
- Avaliar a mortalidade das larvas (imobilidade à estímulos táteis) ao longo do teste e remover as mortas;
- No grupo controle, a mortalidade dos peixes não deve ultrapassar 20%;
- Os organismos que sobreviveram ao fim do ensaio devem ser eutanasiados por congelamento em nitrogênio líquido ou freezer – 80o C;

- Descartar os organismos em freezer para recolhimento por empresa competente;
- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), dureza, pH, temperatura e condutividade;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 22. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriado de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (mL)	Água de diluição (mL)	Volume final (mL) para as 4 réplicas do teste (350 mL) + Extra (200 mL)
100	1.200	-	1.200
50	600	600	1.200
25	300	900	1.200
12,5	150	1.050	1.200
6,2	74,4	1.126	1.200
3,1	37,0	1.163	1.200

h) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 08: Manutenção e ensaio ecotoxicológico com *Danio rerio* adulto

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização do cultivo e ensaios para a determinação da toxicidade aguda de amostras líquidas utilizando como modelo o peixe *Danio rerio* (zebrafish) adulto. A base deste documento é a Norma Técnica ABNT NBR 15088, terceira edição, de 13 de dezembro de 2016.

Como princípio do teste, adultos de *Danio rerio* são expostos a diferentes concentrações da substância-teste, por um período de 48 ou 96 h. Os indivíduos são verificados quanto a sua sobrevivência ao final do teste, e comparados ao grupo controle.

- Material e equipamentos:

- ração comercial de peixe ;
- sistema de aquários com recirculação de água;
- ambiente climatizado com fotoperíodo e temperatura controlados;
- balança analítica;
- balão volumétrico;

- béqueres de volumes variados;
- aquários;
- bastão de vidro para mistura de solução;
- medidor de condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e pH;
- pipeta graduada;
- proveta;
- recipiente-teste de vidro;
- rede para manipular o organismo-teste;
- termômetro;
- Material biológico:
- Os organismos-teste são exemplares de *Danio rerio* (zebrafish) adultos (Figura 3, Figura 4 e Figura 5), obtidos de fonte comercial.

Figura 3. *Danio rerio* adulto.



Figura 4. *Danio rerio* fêmea (acima) e macho.



Figura 5. Larva de zebrafish *Danio rerio*.



- Soluções

- Água para diluição e manutenção: água da torneira filtrada e decolorada com aeração por, no mínimo 48 h. A água de diluição está disponível do Biotério Aquático do ICB-FURG, pois faz parte da rotina deste biotério aerar água para os cultivos.
- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência;

- Cultivo

Condições de uso do material de cultivo

- Qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser lavado antes do uso de acordo com os procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01, ou desinfetado com hipoclorito;
- O sistema de tanques com recirculação de água deve estar previamente limpo para receber os animais, com seu filtro biológico e sistema de purificação UV e termostato funcionando;
- O sistema é preenchido com água da torneira filtrada. A decoloração ocorre pela recirculação da água. O preenchimento com água deve ocorrer uma semana antes da chegada dos animais.

Condições de manutenção e alimentação dos animais

- As condições da água de cultivo e para as diluições do ensaio devem seguir o descrito na Quadro 23.

Quadro 23. Parâmetros da água para manutenção e diluição.

Parâmetro	Condições
Água	Decolorada da rede de abastecimento
pH	6,5 a 7,5
Temperatura	23 a 27°C
OD	> 5 mg/L
Dureza	10 a 60 mg CaCO ₃ /L
Alcalinidade	15 a 250 mg CaCO ₃ /L
Amônia	< 0,05 mg/L NH ₄ ⁺

Parâmetro	Condições
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz com luminosidade difusa
Relação massa / volume	1 g de peixe por litro de água de cultivo

- Alimentar no mínimo 2 vezes ao dia (manhã e tarde) com ração comercial para peixes (Tetramin®). No caso dos animais reprodutores, alimentar 3 vezes ao dia (alimentação extra ao final do dia);
 - Realizar limpeza do sistema no mínimo duas vezes por semana: 1) Desligar a circulação de água no sistema 2) Sifonar ração e outros resíduos do fundo dos aquários com cuidado; 3) Ligar novamente a circulação de água do sistema. Se necessário, devido a alteração nos parâmetros da água, o sistema deve ser esvaziado parcial ou totalmente. Os aquários lavados com esponja e o filtro biológico com água corrente. Neste período os peixes devem ficar acomodados em caixas e a água destes deve ser parcialmente trocada todos os dias;
 - Realizar o controle de amônia, nitrito e pH semanalmente
 - Caso a amônia, nitrito ou pH esteja fora das condições indicadas no realizar a limpeza do sistema imediatamente;
 - Todo o material utilizado no sistema de cultivo de Danio rerio deve ser nomeado e utilizado exclusivamente para esta espécie e sistema;
 - Anotar na planilha de alimentação nome, data e horário em que os peixes foram alimentados;
 - Anotar limpeza do sistema e controle de parâmetros da água em planilhas apropriadas.
- Ensaio de toxicidade com substância de referência
- Calcular o número de organismos previstos para o teste e fazer a compra;
 - O ensaio com substância de referência é realizado em água de diluição;
 - A substância referência indicada é o NaCl;
 - No caso de se usar o NaCl como substância referência, considerar a seguinte faixa de concentração: 8, 9,6, 11,5, 13,8 e 16,5 g/L de NaCl. O Quadro 24 mostra o preparo das soluções-teste. Não há necessidade de se fazer uma solução-estoque de NaCl. O sal é diretamente dissolvido na água, sob agitação com agitador magnético e colocado nos aquários de experimentação.

Quadro 24. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência.

Solução-teste (g/L)	Quantidade de NaCl (g) para 5 L de água de diluição
Controle	-
8,0	40,0
9,6	48,0

Solução-teste (g/L)	Quantidade de NaCl (g) para 5 L de água de diluição
11,5	57,5
13,8	69,0
16,1	80,5

- O preparo das soluções-teste deve ser feito no dia do ensaio. Os recipientes devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), temperatura, dureza, condutividade e pH das soluções, inicialmente, antes de colocar os organismos;
- Colocar os organismos nos aquários com auxílio de puçá, um a um;
- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado, em apenas 1 replicata, com 10 animais por réplica na proporção de 1 g de organismo / L de água: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 6 aquários (Quadro 24);
- Colocar aeração em todos os aquários;
- O teste tem duração de 48 ou 96 h e as condições abióticas são: 14C: 10E e temperatura $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Avaliar a mortalidade dos peixes (parada de batimentos operculares e perda de equilíbrio) ao longo do teste e remover os peixes mortos;
- No grupo controle, a mortalidade dos peixes não deve ultrapassar 10%;
- Os organismos que sobreviveram ao fim do ensaio devem ser eutanasiados com hidrocloreto de benzocaína a 500 mg/L;
- Descartar os organismos em freezer para recolhimento por empresa competente;
- Avaliar as condições finais do ensaio após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), dureza, pH, temperatura e condutividade;
- O Quadro 25 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 25. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Aquários de 8 ou 10 L
Ensaio	Estático para ensaio de 48 h Semiestático com renovação total de meio em 48h do teste de 96 h
Duração do ensaio	48 ou 96 horas
Organismo-teste	<i>Danio rerio</i> - adultos
Meio do ensaio	Água da torneira filtrada e dechlorada
Substância referência	NaCl
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referência ou + 6 concentrações da amostra ambiental
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por aquário	5 L (1 g de organismo / L de água)
Número de Réplicas	1 réplica de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	Sem alimentação – evitar iniciar ensaios às segundas-feiras, pois no fim de semana os animais não são alimentados
Temperatura	24°C ± 2 °C
Fotoperíodo	14 h C: 10 h E
Aeração	Sim
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	Ver Quadro 23
Efeito observado	Mortalidade
Expressão do resultado	Para substância referência: CL ₅₀ (concentração mediana que causa mortalidade em 50 % dos organismos) Para amostra ambiental: CL ₅₀ ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle (Fator de Toxicidade (FT), ou tóxico e não tóxico).

- Ensaio de toxicidade aguda com amostra ambiental (água e elutriato)

- Preparo para o ensaio

Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental:

- Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente overnight (aproximadamente 25o C).

No dia do ensaio:

- Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e água de diluição na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio, fazer um volume total de elutriato de 12 L. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.
 - Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;
 - Adicionar água de diluição e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes de acordo com o Quadro 26;
 - O ensaio deve iniciar somente com as soluções em temperatura de 24o C;
 - A Quadro 26 traz informações sobre o preparo das soluções com amostra ambiental e o Quadro 25 traz as condições do ensaio.
- Ensaio:
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), dureza, condutividade, temperatura e pH da solução-teste inicial. Caso haja necessidade de ajustar o pH para início do teste, este deve ser ajustado de maneira a não alterar significativamente a concentração da solução-estoque, e não provocar reações ou precipitações na substância-teste. HCl e NaOH são os reagentes preferidos para os ajustes necessários. O pH não deve ser ajustado durante o ensaio;
 - Adicionar 10 organismos em cada recipiente-teste, um a um, com auxílio de puçá;
 - O ensaio deve ser encerrado após 48 ou 96 h;
 - Avaliar a mortalidade dos peixes (parada de batimentos operculares e perda de equilíbrio) ao longo do teste e remover os peixes mortos;
 - No grupo controle, a mortalidade dos peixes não deve ultrapassar 10%;
 - Os organismos que sobreviveram ao fim do ensaio devem ser eutanasiados com hidrócloridrato de benzocaína a 500 mg/L;
 - Descartar os organismos em freezer para recolhimento por empresa competente;
 - Avaliar as condições finais do ensaio após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), dureza, pH, temperatura e condutividade;
 - Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
 - Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 26. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriato de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (L)	Água de diluição (L)	Volume final para as 1 réplica do teste (L)
100	5	-	5
50	2,5	2,5	5
25	1,25	3,75	5
12,5	0,83	4,17	5
6,2	0,625	4,375	5
3,1	0,5	4,5	5

i) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 09: Ensaio ecotoxicológico com o ouriço do mar *Echinometra lucunter* – fertilização e desenvolvimento embrio-larval

• Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização de ensaios para a determinação da toxicidade crônica de curta duração de substância referencia e amostra ambiental para o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* Linnaeus, 1758 (Echinodermata: Echinoidea).

A base deste documento é a Norma Técnica ABNT NBR 15350, segunda edição, de 12 de janeiro de 2012, que avalia a toxicidade crônica de curta duração de amostras de água marinha, estuarina, intersticial de sedimento, interface sedimento e água, efluentes líquidos, elutriato, substâncias químicas solúveis ou dispersas em água, para o desenvolvimento embrio-larval de *Echinometra lucunter*; e no livro "Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil" de Nascimento, I,A; Sousa, E,C,P,M, & Nipper, M,G para avaliação da toxicidade aguda das mesmas amostras sobre a fertilização de gametas de *E. Lucunter*.

• Material e equipamentos:

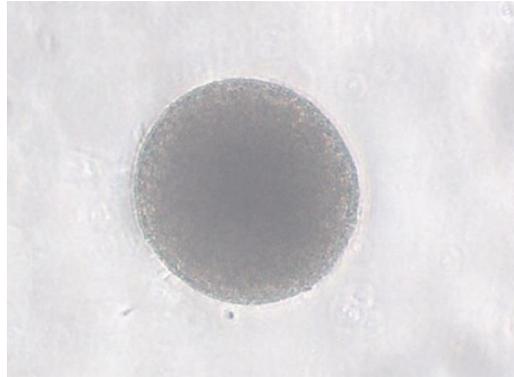
- Agulha e seringa de 2 a 5 mL para aplicação de KCL nos organismos adultos;
- Balança analítica;
- Balão volumétrico;
- Béquer;
- Câmara de Sedgwick-rafter;
- Medidor de oxigênio dissolvido;
- Medidor de ph;

- Medidor de salinidade;
 - Medidor de condutividade;
 - Microscópio óptico;
 - Peneira com malha de 350 μm ;
 - Pipeta pasteur de plástico para manuseio dos óvulos e ovos;
 - Pipeta automática;
 - Proveta;
 - Recipiente para manutenção dos organismos adultos;
 - Termômetro;
 - Tubo de ensaio com capacidade para 20 ml, com tampa, para armazenamento das amostras ao final do experimento ou frascos de cintilação de 20 mL;
 - Incubadora ou sala climatizada com capacidade para manter temperatura controlada entre 20 e 30° C
- Material biológico
 - Gametas e ovos de *Echinometra lucunter* fecundados *in vitro*, obtidos de fêmeas e machos adultos (Figura 6 e Figura 7).

Figura 6. Ovo fecundado



Figura 7. Óvulo não fecundado



- Soluções

- Água para diluição e manutenção: água natural do mar filtrada (malha 5, 10 e 100 μm), esterilizada com UV na salinidade e pH ambientes, captada por sistema de captação de água do mar da Base Oceanográfica da UFES. Deve ser obtida logo antes de seu uso no ensaio;
- Solução de KCl 0,5M;
- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência;
- Elutriato: solução aquosa obtida após adição de água de diluição a uma amostra sólida submetida à agitação e posterior decantação ou, quando necessário, centrifugação ou filtração.

- Coleta dos organismos adultos

- Preparo para coleta

- Checar a tábua de maré, evitando dias chuvosos e escolhendo o momento de maré baixa (0.0). Chegar no local com 30 min de antecedência;
- Separar caixa térmica, luvas e formão;
- Levar a licença do SISBIO para a coleta.

- Coleta

- Coletar manualmente de 12 a 20 exemplares de Echinometra lucunter que apresentem boa formação corporal de médio a grande;
- Colocar os organismos em caixa térmica com pouca água e transportá-los imediatamente para o laboratório, onde eles devem ser acondicionados em caixas com água natural marinha e salinidade correspondente a do local da coleta, e aeração forte;

- Anotar as condições da coleta na ficha de amostragem.

- Desova

- Lavar os organismos com água natural do mar filtrada para remoção de fezes e outros detritos.
- Injetar 2,5 mL de KCl 0,5M na região perioral do ouriço, agitar o ouriço suavemente. Os gametas são liberados através dos gonóporos, localizados na superfície aboral do ouriço. Gametas laranjas são indicativos de fêmeas e brancos de espermatozoides;
- Os gametas devem ser coletados separadamente;
- Para coleta dos óvulos (coloração amarelo-alaranjadas), as fêmeas devem ser apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo em um recipiente (béquer) menor que seu diâmetro, de modo que os gonóporos fiquem imersos na água do mar natural filtrada;
- Os óvulos devem ser coletados, assim que a fêmea desovar, por um período máximo de 15 min, para evitar que sejam utilizados os imaturos;
- Com pipeta Pasteur, retirar uma subamostra dos óvulos de cada fêmea e observá-los ao microscópio, estes devem ser arredondados, lisos e de tamanho homogêneo. Os lotes de óvulos com tamanho irregular devem ser descartados;
- Selecionar os lotes viáveis e reuni-los em um béquer de 2 L, esperar a sedimentação dos óvulos, descartar o sobrenadante e, se possível filtrá-lo em malha de 350 µm para um outro béquer de 2 L. Acrescentar água do mar natural filtrada até o volume de 600 ml aos óvulos sedimentados ou filtrados.
- Fazer uma diluição de 100% de uma alíquota para contagem (1 mL de solução de óvulos em 99 mL de água marinha natural). Contar os óvulos em câmara de Sedgwick-rafter. O resultado de contar a câmara toda é o num de óvulos / mL x 100 (diluição). Calcular volume o necessário para se pipetar 2 mil óvulos.
- Para coleta dos espermatozóides, identificado por sua cor branca, coletar com pipeta automática no volume aproximado de 100 µL para cada macho, e anotar os valores coletados. Esse esperma deve ser colocado em béquer, separado para cada macho, em recipiente com gelo.
- Para ativar os espermatozóides, preparar uma solução de espermática na proporção de 0,5 mL de esperma para 25 mL de água natural do mar filtrada, misturando-se bem para dissolução de grumos.
- A solução espermática deve ser preparada após o término da contagem dos óvulos e usada imediatamente para os ensaios de toxicidade.
- Primeiro prepara-se o ensaio com gametas, pipetando os espermatozóides separadamente nas soluções-teste previamente preparadas (item e);

➤ Em segundo lugar, mistura-se de 4 a 5 mL de espermas de macho com os 600 mL de óvulos, na proporção preferencial de 3 fêmeas para 3 machos, ou 1:1, e aguarda 2 horas para fecundação dos óvulos. Os ovos fecundados são contados para o ensaio de desenvolvimento embrio-larval (item f). Antes são diluídos 100% (1 mL de solução de óvulos em 99 mL de água marinha natural). A contagem ocorre igualmente na Sedgwick-rafter. O resultado de contar a câmara toda é o num de ovos fecundados / mL x 100 (diluição). Calcular o volume necessário para se pipetar 600 ovos fecundados nos tratamentos.

Após a desova, devolver os organismos para seu ambiente natural. Para o descarte dos óvulos e da solução espermática, adicionar hipoclorito (5%), aguardar 24 h e descartar na pia.

- Ensaio de toxicidade com gametas – teste agudo de fertilização

Este método consiste na exposição de gametas de ouriço-do-mar a diferentes concentrações de substância referência ou diluições de amostra ambiental e ao fim do período de exposição, observa-se o percentual de ovos fertilizados.

- Preparo para o ensaio - Dia anterior à coleta dos organismos

➤ Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente (aproximadamente 25o C);

➤ Para preparar o elutriato (no fim do dia anterior ao ensaio), mistura-se sedimento bruto e água salgada natural e filtrada na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio o volume total de elutriado é de 250 ml;

➤ Nomear os frascos de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água, elutriato e substância de referência;

➤ Pipetar nos frascos as soluções-teste contendo as amostras ambientais de água, elutriato e substância referência. Armazenar na geladeira;

➤ Os Quadro 27 e Quadro 28 trazem informações sobre o preparo das soluções com substância referência e amostra ambiental, respectivamente.

- No dia da coleta retirar os tubos de ensaio da geladeira antes de coletar os ouriços para que estabilizem à temperatura ambiente.

Preparo de soluções-teste com substância referencia

A substância de referência utilizada é Zinco (Zn), a partir de solução de sulfato de Zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$):

Calculo para solução de 1 g/L de Zn:

287,54 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 65,4 g Zn

x - 1 g Zn / x = 4,4g ZnSO₄.7H₂O em 1L x 0,1L = pesar 0,440 g em 100 mL de água MiliQ (acidificar com H₂NO₃ 0,5 % - adicionar 750 µL do ácido antes de completar os 100 mL de volume total no balão volumétrico) – Esta solução pode ficar estocada e sendo usada por 60 dias na geladeira (4° C).

Antes de preparar as soluções-teste para o ensaio, diluir 100 x a solução de 1g/L de Zn (estoque), sendo 1 ml da solução estoque em 9 ml de água natural do mar, para obter uma solução a 10 mg/L de Zn (esta é a solução-mãe adicionada aos recipientes do ensaio). A diluição deve ser feita em água natural marinha, mesma água de diluição usada para os ensaios.

Quadro 27. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência.

Concentração da Solução de Zn (mg/L)	Solução-mãe de Zn a 10 mg/L (mL)	Água de diluição (mL)	Volume final no frasco (mL)
Controle	0	10	10
0,015	0,015	9,99	10
0,03	0,03	9,97	10
0,06	0,06	9,94	10
0,12	0,12	9,88	10
0,24	0,24	9,76	10
0,48	0,48	9,52	10

* A Cl₅₀ fica em torno de 0,2 mg/L de Zn

Preparo de soluções-teste com amostra ambiental

Quadro 28. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriado de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (mL)	Água de diluição (mL)	Volume final no frasco (mL)
100	10	-	10
50	5	5	10
25	2,5	7,5	10
12,5	1,25	8,75	10
6,2	0,62	9,38	10
3,1	0,31	9,69	10

Nomear os tubos de ensaio de acordo com as concentrações.

- Ensaio com gametas

➤ O ensaio deve ser feito em quintuplicata, sendo quem uma delas é adicional para medidas dos parâmetros físico-químicos iniciais do ensaio, como oxigênio dissolvido (OD), pH, salinidade e condutividade. Neste frasco extra não serão pipetados os gametas. Estes parâmetros iniciais são considerados tanto para o ensaio com gameta como para o embrio-larval;

➤ Pipetar 20 µL de espermatozóide recém-ativado (final do item 4.3) em cada frasco contendo 10 mL de solução-teste ou controle (em quadruplicata). Esperar 20 minutos;

- Após pipetar o volume necessário para ter 2 mil ovos em cada um dos frascos (ver item 4.3 – este volume vai depender da concentração de óvulos (n. De óvulos / mL resultante das desovas bem-sucedidas);
- Após 40 min analisa-se um dos controles na câmara de Sedgwick-rafter e conta-se 1 lâmina. Se os ovos fecundados forem superiores à 85 %, encerra-se o ensaio, caso contrário espera-se mais 10 min e faz-se outra contagem, até atingir o percentual de fecundação desejado para o controle;
- O teste é encerrado através da adição de 0,5 ml de formol a 40%, tamponado com bórax. Dessa forma, as amostras ficam preservadas para posterior análise;
- A contagem de ovos fecundados e dos óvulos não fecundados é feita ao microscópio com um aumento de 100 vezes (Figuras 1 e 2). Para o cálculo o percentual de ovos fecundados indicativos de fertilização bem-sucedida, devem ser considerados os 100 primeiros óvulos/ovos observados;
- Faz-se uma contagem para cada réplica;
- As condições gerais do ensaio encontram-se no Quadro 29;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 29. Resumo dos requisitos para o ensaio com gametas – fertilização

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Frasco de cintilação de 20 mL ou tubo de ensaio de 20 mL
Ensaio	Estático – sem renovação do meio
Duração do ensaio	40 min até 2 h – até fecundação no controle atingir 85 % dos óvulos
Organismo-teste	Esperma (20 µL) + óvulos (2 mil)
Meio do ensaio	Água de diluição, ou seja, água do mar natural filtrada e esterilizada com UV
Substância referência	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referencia ou Controle + 6 diluições da amostra ambiental (água ou elutriato)
Soluções-tese	Substância referencia ou amostra ambiental
Volume final de meio por frasco	10 mL
Número de Réplicas	4 réplicas de cada tratamento + 1 réplica sem adição de gametas para leitura inicial dos parâmetros físico-químicos * são 30 frascos para o ensaio referencia e 35 para ensaio com amostra ambiental
Número de organismos por réplica	20 µL de esperma (diluído na proporção de 0,5 mL de esperma para 25 mL de água do mar natural) + 2 mil óvulos
Alimentação	Sem alimentação
Temperatura	26 a 28° C
Salinidade	30 a 37 – de preferência igual ao do local / momento de amostragem dos ouriços

Requisitos	Condições
Luz	Usual em laboratório
Fotoperíodo	-
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	4,5 a 6 mg/L OD, pH 7,6 - 8,4
Efeito observado	Proporção de ovos fecundados / numero total de ovos
Expressão do resultado	CI ₅₀ (concentração mediana de inibição de fertilização para 50 % dos ovos), ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle.

- Ensaio de toxicidade crônico de curta duração – teste embrio-larval

Este método consiste na exposição de ovos de ouriço-do-mar a diferentes concentrações de substância referência ou diluições de amostra ambiental e ao fim do período de exposição, observa-se o desenvolvimento embrio-larval dos ouriços.

O preparo das amostras 1 dia antes do ensaio é o mesmo do item (e). As amostras descongeladas são usadas para ambos os ensaios, pode-se inclusive fazer um volume maior de soluções-teste e distribuí-las entre os ensaios com gametas e embrio-larval.

Para o ensaio embrio-larval usa-se os ovos fecundados, descrito no item (d).

- Em resumo: pipetar de 4 a 5 ml da solução espermática no béquer contendo os óvulos avolumados em 600 ml e levar para a incubadora, esperar 2 horas. Após 2 horas, pegar 1 ml dos ovos e avolumar para 100 ml com água natural do mar filtrada em um balão volumétrico, depois observá-los ao microscópio em câmara de Sedgwick-rafter. Deve-se ter uma proporção de 90% de ovos fecundados em 1 lâmina, caso isso não ocorra-esperar mais 30 min e analisar novamente até que este valor de 90 % seja atingido.
- Assim que 90 % dos óvulos estiverem fecundados fazer o cálculo do volume necessário para se ter 600 ovos. A contagem de 1 lâmina oferece o valor de num de ovos/ mL, usa-se esse valor de contagem para calcular o volume para 600 ovos.
- Adicionar os 600 ovos em cada frasco previamente preenchido com 10 mL da solução-teste (ver item 5.1). O teste é feito em quadriplicata, exceto o controle que é feito em sextuplicata;
- Levar o ensaio à incubadora, anotar o horário, e deixar por, no mínimo, 36 h. A partir desse tempo iniciar as contagens nos controles aleatoriamente de 1 em 1 hora ou 2 em 2 horas, até que sejam registradas 90 % de larvas bem desenvolvidas na contagem de 1 câmara Sedgwick-Rafter inteira. Estágio bem desenvolvido é quando as larvas atingem estágio de pluteus bem desenvolvido, com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo da larva (Figura 3). Isto é verificado em microscópio óptico. Se esse valor de 85 % de larvas bem desenvolvidas for alcançado, o ensaio deve ser encerrado;

- Antes de encerrar o ensaio, os parâmetros físico-químicos (OD, pH, salinidade e condutividade) devem ser novamente medidos em uma das réplicas;
- O teste é encerrado através da adição de 0,5 ml de formol tamponado com bórax a 10%, com leve agitação. Dessa forma, as amostras ficam preservadas para posterior análise;
- Para leitura do ensaio, analisar em câmara de Sedgwick-Rafter o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos em cada réplica. Primeiramente, deve ser analisado o controle, pois este deve ser utilizado como referência para leitura das soluções-teste, que deve ser aleatória. Anotar os valores para cada réplica em cada concentração-teste;
- São considerados anormais os estágios anteriores à larva pluteus (ovo, mórula, blástula e gástrula), os pluteus com atraso no desenvolvimento em relação ao controle e os organismos deformados;
- As anomalias são consideradas efeito, devendo-se somar, em cada solução-teste, o total de organismos afetados. Os óvulos eventualmente encontrados nas amostras não podem ser considerados, pois não foram fecundados;
- As condições gerais do ensaio encontram-se no Quadro 30;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

• Figura 3 - Larva desenvolvida



Quadro 30. Resumo dos requisitos para o ensaio crônico de desenvolvimento embrio-larval

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Frasco de cintilação de 20 mL ou tubo de ensaio de 20 mL
Ensaio	Estático – sem renovação do meio
Duração do ensaio	36 à 48 h - até que 90% das larvas do controle estejam desenvolvidas (larvas pluteus normais).

Requisitos	Condições
Organismo-teste	ovos fecundados
Meio do ensaio	Água de diluição, ou seja, água do mar natural filtrada e esterilizada com UV
Substância referência	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referencia ou Controle + 6 diluições da amostra ambiental (água ou elutriato)
Soluções-tese	Substância referencia ou amostra ambiental
Volume final de meio por frasco	10 mL
Número de Réplicas	6 réplicas para o controle e 4 réplicas de soluções-teste de substância referência ou amostra ambiental. A réplica para medida inicial dos parâmetros físico-químicos é a mesma do ensaio de fertilização * são 26 frascos para o ensaio referencia e 30 para ensaio com amostra ambiental
Número de organismos por réplica	600 ovos fecundados
Alimentação	Sem alimentação
Temperatura	26 a 28° C
Salinidade	30 a 37 – de preferência igual ao do local / momento de amostragem dos ouriços
Luz	Usual em laboratório
Fotoperíodo	12 h C: 12 h E
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	4,5 a 6 mg/L OD, pH 7,6 - 8,4 Os parâmetros iniciais são os mesmos do teste de fertilização, os finais são medidos em uma das réplicas antes de adição de formalina para fixação
Preservação da amostra	Ao fim do ensaio adicionar 0,5 ml de formol tamponado com bórax a 10% e agitar levemente
Efeito observado	Retardo ou anomalias embrio-larvais
Validade do ensaio	Mínimo de 80 % das larvas pluteus normais no controle
Expressão do resultado	Proporção de larvas desenvolvidas / numero total de larvas; CI ₅₀ (concentração mediana de inibição de desenvolvimento para 50 % das larvas); análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle; CENO, CEO, VC Clp – olhar norma ABNT NBR 15350

j) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 10: Manutenção e ensaio ecotoxicológico com *Poecilia vivípara*

• Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a realização e manutenção do cultivo e reprodução do peixe *Poecilia vivípara* e ensaios com substância de referência e amostra ambiental. A base deste documento é a Norma Técnica OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 203 – Fish acute toxicity test.

Como princípio do teste, adultos de *Poecilia vivipara* são expostos a diferentes concentrações da substância-teste, por um período de 48 ou 96 h. Os indivíduos são verificados quanto a sua sobrevivência ao final do teste, e comparados ao grupo controle.

- Material e equipamentos

- ração comercial de peixe;
- sistema de aquários com recirculação de água;
- ambiente climatizado com fotoperíodo e temperatura controlados;
- balança analítica;
- balão volumétrico;
- béqueres de volumes variados;
- bastão de vidro para mistura de solução;
- medidor de condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e pH;
- pipeta graduada;
- proveta;
- recipiente-teste de vidro;
- rede para manipular o organismo-teste;
- termômetro;
- recipiente para coleta dos filhotes.

- Material biológico

- Os organismos-teste são exemplares de *Poecilia vivipara* (espécie de “barrigudinho”) juvenis (Figura 8), obtidos de matrizes coletadas no ambiente e mantidas no Biotério Aquático do ICB - FURG.

Figura 8. *Poecilia vivipara* fêmea (maior) e juvenil (menor) e Sistema de cultivo de *P. vivipara*.



- Soluções

- Água para diluição e manutenção: água da torneira decolorada com adição de sal marinho na salinidade 30 (ex. para 1 litro de água, pesar 30 g de sal marinho);
- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência.

- Cultivo

- Condições de uso do material de cultivo

- Qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser lavado antes do uso de acordo com os procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01, ou desinfetado com hipoclorito;
- O sistema de tanques com recirculação de água deve estar sempre limpo para receber os animais, com seu skimmer, filtro biológico e sistema de purificação UV e termostato funcionando;
- O sistema é preenchido com água da torneira filtrada e salinizada à 30. A decoloração ocorre pela recirculação da água.

- Condições de manutenção e alimentação dos animais:

- As condições da água de cultivo e para as diluições do ensaio devem seguir o descrito no Quadro 31.

Quadro 31. Parâmetros da água para manutenção e diluição.

Parâmetro	Condições
Água	Decolorada da rede de abastecimento com adição de sal marinho
Salinidade	30 ± 2
pH	6,5 a 8,5
Temperatura	23 a 27°C
OD	> 5 mg/L
Amônia	< 0,05 mg/L NH ₄ ⁺
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz com luminosidade difusa
Relação massa / volume	1 g de peixe por litro de água de cultivo

- Alimentar no mínimo 2 vezes ao dia (manhã e tarde) com ração comercial para peixes (Tetramin®). No caso dos animais reprodutores, alimentar 3 vezes ao dia (alimentação extra ao final do dia);

- Realizar limpeza do sistema no mínimo duas vezes por semana: 1) Desligar a circulação de água no sistema 2) Sifonar ração e outros resíduos do fundo dos aquários com cuidado; 3) Ligar novamente a circulação de água do sistema. Se necessário, devido a alteração nos parâmetros da água, o sistema deve ser esvaziado parcial ou totalmente. Os aquários lavados com esponja e o filtro biológico com água corrente. Neste período os peixes devem ficar acomodados em caixas e a água destes deve ser parcialmente trocada todos os dias;
 - Realizar o controle de amônia, nitrito e pH semanalmente;
 - Caso a amônia, nitrito ou pH esteja fora das condições indicadas no Quadro 31, realizar a limpeza do sistema imediatamente;
 - Todo o material utilizado no sistema de cultivo deve ser nomeado e utilizado exclusivamente para esta espécie e sistema;
 - Anotar na planilha de alimentação nome, data e horário em que os peixes foram alimentados;
 - Anotar limpeza do sistema e controle de parâmetros da água em planilhas apropriadas.
- Obtenção de organismos jovens:
- Os aquários devem ser mantidos com machos e fêmeas da espécie *Poecilia vivípara*. As fêmeas devem ser separadas e isoladas dos machos em aquários com chocadeiras para liberar seus filhotes;
 - Os filhotes devem ser recolhidos após seu nascimento para outro aquário, onde serão engordados com ração até que atinjam o tamanho de 2 ± 1 cm para serem usados no ensaio.
 - Ensaio de toxicidade com substância de referência
 - Calcular o número de organismos previstos para o teste;
 - O ensaio com substância de referência é realizado em água de diluição;
 - A substância referência indicada é o dodecil sulfato de sódio (DSS);
 - Utilizar as concentrações de 0,4, 0,7, 1,2, 2,3 e 4,1 mg/L de DSS. O Quadro 32 mostra o preparo das soluções-teste. O volume final de cada solução teste é de 600 ml, respeitando a densidade de 1g de animal/L;
 - Fazer uma solução estoque de 1g/L de DSS: pesar 0,1g em 100ml de água de diluição para adicionar nos recipientes-teste. A solução deve ser preparada logo antes do ensaio, devido a sua rápida degradação.

Quadro 32. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referência.

Solução-teste (mg/L)	Volume de solução-trabalho de 1 g/L de DDS (mL)	Volume de água de diluição na salinidade 30 (mL)	Volume final para as 1 réplica do teste (mL)
Controle	-	600	600
0,4	0,24	599,76	600
0,7	0,42	599,58	600
1,2	0,72	599,28	600
2,3	1,73	598,27	600
4,1	2,46	597,54	600

- O preparo das soluções-teste deve ser feito no dia do ensaio. Os recipientes-teste devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- Medir o oxigênio dissolvido (OD), temperatura, salinidade, condutividade e pH das soluções, inicialmente, antes de colocar os organismos;
- Colocar os organismos nos aquários com auxílio de puçá, um a um;
- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado, em apenas 1 replicata, com 10 animais por réplica na proporção de 1 g de organismo / L de água: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 6 recipientes-teste (ver Quadro 32);
- Colocar aeração em todos os recipientes;
- O teste tem duração de 48 ou 96 h e as condições abióticas estão no Quadro 31;
- Avaliar a mortalidade dos peixes (parada de batimentos operculares e perda de equilíbrio) ao longo do teste e remover os peixes mortos;
- No grupo controle, a mortalidade dos peixes não deve ultrapassar 10%;
- Os organismos que sobreviveram ao fim do ensaio devem ser eutanasiados com hidrocloreto de benzocaína a 500 mg/L;
- Descartar os organismos em freezer para recolhimento por empresa competente;
- Avaliar as condições finais do ensaio após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura, salinidade e condutividade;
- O Quadro 33 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 33. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência e amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Aquários ou béqueres com capacidade para 1 L
Ensaio	Estático para ensaio de 48 h Semiestático com renovação total de meio em 48h do teste de 96 h
Duração do ensaio	48 ou 96 horas
Organismo-teste	<i>Poecilia vivípara</i> – juvenis (2 ± 1 cm)
Meio do ensaio	Água da torneira filtrada e declorada com adição de sal marinho para obter salinidade 30 (adição de 30 g de sal em 1 L de água)
Substância referência	DSS
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referência ou + 6 concentrações da amostra ambiental
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por aquário	600 mL (1 g de organismo / L de água)
Número de Réplicas	1 réplica de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	Sem alimentação – evitar iniciar ensaios às segundas-feiras, pois no fim de semana os animais não são alimentados
Temperatura	24°C ± 2 °C
Fotoperíodo	14 h C: 10 h E
Aeração	Sim
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	Ver Quadro 31
Efeito observado	Mortalidade
Expressão do resultado	Para substância referência: CL ₅₀ (concentração mediana que causa mortalidade em 50 % dos organismos) Para amostra ambiental: CL ₅₀ ou análise estatística quali e quantitativa de toxicidade em relação ao controle (Fator de Toxicidade (FT), ou tóxico e não tóxico).

- Ensaio de toxicidade aguda com amostra ambiental (água e elutriato)

- Preparo para o ensaio

Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental

- Descongelar as amostras de sedimento e água em caixa térmica à temperatura ambiente overnight (aproximadamente 25o C).

No dia do ensaio:

- Para preparar o elutriato, mistura-se sedimento bruto e água de diluição na salinidade 30 na proporção de 1:4. Tem que se fazer o cálculo de que volume de água será necessário para rodar o teste e a partir daí calcular o volume de sedimento a ser usado. Para cada ensaio, fazer um volume total de elutriato de 2 L. A utilização do elutriato não pode passar de 24 h depois de feito. A espera deve ser sobre refrigeração.
- Nomear os recipientes de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de água ou elutriato;
- Adicionar água de diluição e amostra ambiental (água ou elutriato) nos recipientes;
- O ensaio deve iniciar somente com as soluções em temperatura de 24o C;
- O Quadro 34 traz informações sobre o preparo das soluções com amostra ambiental e o Quadro 33 traz as condições do ensaio.

- Ensaio:

- Medir o oxigênio dissolvido (OD), salinidade, condutividade, temperatura e pH da solução-teste inicial;
- Adicionar 10 organismos em cada recipiente-teste, um a um, com auxílio de puçá;
- O ensaio deve ser encerrado após 48 ou 96 h;
- Avaliar a mortalidade dos peixes (parada de batimentos operculares e perda de equilíbrio) ao longo do teste e remover os peixes mortos;
- No grupo controle, a mortalidade dos peixes não deve ultrapassar 20%;
- Os organismos que sobreviveram ao fim do ensaio devem ser eutanasiados com hidrocloreto de benzocaína a 500 mg/L;
- Descartar os organismos em freezer para recolhimento por empresa competente
- Avaliar as condições finais do ensaio após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura, salinidade e condutividade;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 34. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com amostras de água do ambiente previamente descongelada ou com elutriado de sedimento.

% de Amostra	Amostra ambiental (mL)	Água de diluição na salinidade 30 (mL)	Volume final para as 1 réplica do teste (L)
100 %	600	-	600
50 %	300	300	600
25 %	150	450	600
12,5 %	75	525	600
6,2 %	37,5	562,5	600
3,1 %	18,7	581,3	600

k) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 11: Manutenção e ensaio ecotoxicológico com Nitokra spp

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a manutenção do cultivo do copépode Nitokra sp e realização de ensaios com substância referencia e amostra de sedimento ambiental. A base deste documento o livro "Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil" de Nascimento, I,A,; Sousa, E,C,P,M, & Nipper, M,G para avaliação da com sedimento total e água intersticial utilizando copépodos bentônicos.

- Material e equipamentos

- Lupa;
- Erlenmeyers de 1 e 2 L;
- Béqueres de volumes variados;
- Fracos de cintilação de 20 mL com tampa;
- Incubadora ou sala climatizada com capacidade para manter temperatura controlada entre 20° C e 25 ° C;
- Medidores de oxigênio dissolvido, pH e condutividade;
- Pipetas pasteur e automáticas;
- Sal marinho;
- Refratômetro;
- Malhas de 120 µm e 60 µm;
- Placas de petri;

- Pisseta;
- Ponteiras (10 -100 µL e 100 – 1000 µL);
- Balão volumétrico – volumes variados;
- Ração comercial de peixe;
- Fermento biológico;
- Gaze;
- Algodão.

- Cultivo

- Condições de uso do material de cultivo

- Qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser feito de vidro ou outro material quimicamente inerte.
- O material deve ser lavado antes do uso, de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01.
- Os recipientes lavados devem ser tampados para evitar a entrada de poeira.

- Meio de cultivo (água processada)

- Em um recipiente resistente à autoclave (por ex. erlenmeyer de 2 L) fazer água processada na salinidade 17, a qual é recomendada para o cultivo (ex. para 1 litro de água, pesar 17 g de sal marinho).
- Agitar a mistura de água e sal até que todo sal esteja completamente dissolvido;
- Verificar a salinidade em refratômetro previamente calibrado;
- Cobrir o recipiente contendo a água processada com papel pardo e levar à autoclave por 25-30 minutos após a pressão chegar a 1 kgf/cm²
- Autoclavar água destilada adicional para possíveis necessidades de diluição da água processada autoclavada;
- Esperar que o material autoclavado esfrie e medir novamente a salinidade. Caso necessário, aferir a salinidade para 17 com adição de água autoclavada ou sal marinho.

- Montagem do cultivo

- O cultivo deve ser mantido em erlenmeyers de 1 L. Cada cultivo deve possuir identificação: número do cultivo, data de início do cultivo e nome do responsável pelo cultivo;

- Para fazer o cultivo, filtrar as Nitokra sp em malha de 20 a 60 μm . As malhas de 20 a 60 μm retêm náuplios, copepoditos e fêmeas adultas. Para iniciar um cultivo apenas com fêmeas deve-se fazer a filtragem somente em malha de 120 μm ;
- O material que passar pela malha (filtrado) deve ser descartado;
- A malha contendo organismos deve ser lavada com água processada na salinidade 17, previamente autoclavada, para um béquer com diâmetro maior do que o suporte onde a malha está fixada (pode utilizar uma pisseta para esta lavagem);
- Levar parte desta solução concentrada de organismos para uma placa de petri e observar na lupa a presença dos mesmos, identificando fêmeas ovadas/não ovadas, náuplios e copepoditos. Para melhor visualização na lupa, pode-se colocar a placa de petri em cima de uma caixa de luz e pipetar os organismos em “gotas” ou “poças” para outra placa e levar essa 2a placa à lupa para caracterização dos organismos;
- Despejar o conteúdo do béquer com os organismos em um erlenmeyer de 1 L e aferir o volume para 700 mL com água autoclavada a 17.
- O procedimento deve ser repetido com renovação parcial do meio a cada 15 dias e renovação total uma vez por mês;
- Caso o cultivo esteja com alta densidade, dividir o conteúdo do erlenmeyer em 2 (abrir novo cultivo), repetindo os passos anteriores, inclusive com relação a identificação. A primeira renovação de meio de um cultivo novo deve ocorrer 20 a 25 dias após seu início.

- Alimentação e condições abióticas do cultivo

- Preparo de ração: em um béquer de 2 L colocar 10 g de ração comercial para peixe em 1L de água MiliQ ou destilada autoclavada e deixar agitando em agitador magnético por 1 h. Após deixar decantar por mais 1 hora. Retirar o sobrenadante e adicionar fermento biológico na proporção de 0,5 g a cada 100 mL, agitar por 5 min em agitador magnético, esperar decantar por 5 min e retirar o sobrenadante. Armazenar em geladeira e identificar o material incluindo data de fabricação da ração (validade de 30 dias);
- Colocar 1 mL da ração preparada em cada cultivo (volume de 700 mL) 3 vezes por semana (preferência: segundas, quartas e sextas);
- Alimentação adicional pode ser feita com microalgas vivas, para tanto adicionar de 1 a 2 mL de uma espécie de alga marinha em concentração que varie de 10^4 a 10^6 , 3 vezes por semana (preferência: segundas, quartas e sextas). Sugestão de algas marinhas: *Isocrysis galbana*, *Thalassiosira* sp, *Nannochloropsis* sp. As algas devem ser cultivadas em meio F2 e mantidas sob luz constante. O meio de cultivo das algas deve ser previamente autoclavado.
- Os cultivos devem ser mantidos em sala climatizada ou em incubadora (câmara de germinação) com fotoperíodo ajustado para 16 h C: 8 h E, e temperatura 24 ± 2 o C;

➤ Os cultivos devem receber alimentação por 3 dias consecutivos antes do ensaio apenas com ração.

- Ensaio de toxicidade com substância de referência

- O ensaio com substância de referência é realizado em água, sem necessidade de sedimento;
- As substâncias referencias indicadas são Zn ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ou dodecil sulfato de sódio (DDS);
- No caso de se usar o Zn como substância referência, considerar a seguinte faixa de concentração variando de 0,25 a 4,0 mg/L de Zn. Os Quadro 35 e Quadro 36 mostram o cálculo para solução-estoque a partir do $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e exemplo de preparo de soluções-teste, respectivamente.

Quadro 35. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência.

Reagente	Quantidade (g)	Preparo
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ Para solução de Zn 10 g/L	2,2	Dissolver em água MiliQ e aferir o volume em balão volumétrico para 50 mL

O sal deve ser dissolvido em água MiliQ, acidificar com 0,5 % de HNO_3 e o volume final da solução aferido em balão volumétrico. Logo antes do preparo das soluções-teste, diluir 100 x a solução estoque de 10 g/L de Zn (colocar 100 μ L de solução estoque a 10 g/L de Zn em 100 mL de água na salinidade 17) – dessa forma têm-se uma solução-trabalho de 100 mg/L de Zn. Caso a solução seja feita imediatamente antes do seu uso, calcular a mesma para 100 mg/L de Zn (pesar 0,022 g em 50 mL e água na salinidade 17) e não acidificar.

Quadro 36. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referencia

Solução-teste (mg/L)	Volume de solução-trabalho de 100 mg/L Zn (mL)	Volume de água de diluição na salinidade 17 (mL)	Volume final no teste (mL)
0,25	0,04	14,96	15
0,5	0,075	14,92	15
1,0	0,15	14,85	15
2,0	0,3	14,7	15
4,0	0,6	14,4	15

- Medir o oxigênio dissolvido (OD) e salinidade inicial da água de diluição (água processada autoclavada na salinidade 17), e anotar no formulário referente ao ensaio;
- Os frascos para o teste de referência devem ser preparados de 12 à 24 h antes do teste e deixados na incubadora onde o ensaio vai ocorrer;
- Os frascos devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado, em triplicata, com 10 animais por frasco: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 18 frascos de exposição;
- O volume final de solução a ser adicionada em cada frasco de cintilação é de 15 ml;

- Para o início dos ensaios, exemplares fêmeas de *Nitokras* sp devem ser triadas e adicionadas nos frascos uma a uma (fazer a triagem com auxílio de caixa de luz e lupa);
- Para o ensaio referência não existe necessidade de se utilizar fêmeas ovadas;
- Por fim, tampa-se os frascos com parafilme furado com agulha fina;
- O teste tem duração de 96 h e as condições abióticas são: 16 h C: 8 h E e temperatura 24 ± 2 ° C e sem aeração;

O Quadro 37 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;

- Ao fim do ensaio (96 h de exposição), filtrar as fêmeas em malha de 120 μ m e realizar a contagem e verificação na lupa, sendo 1 frasco por vez. Obs. Caso as 10 fêmeas não sejam encontradas para contagem, refiltrar o conteúdo do frasco em malha de 60 μ m;
- Fêmeas são consideradas mortas quando não há movimentação espontânea ou reação à estímulos táteis usando ponteira fina (pipeta pasteur de vidro, por exemplo);
- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas antes ou após a retirada dos animais, como oxigênio dissolvido (OD), salinidade inicial, pH, temperatura e condutividade;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Descartar a solução que contenha Zn em descarte de resíduos;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 37. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Frasco de cintilação de 20 mL
Ensaio	Estático – sem renovação do meio
Duração do ensaio	96 horas
Organismo-teste	Fêmeas adultas – <i>Nitokra</i> sp
Meio do ensaio	Água processada autoclavada na salinidade 17
Substância referência	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referencia
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por frasco	15 mL
Número de Réplicas	3 réplicas de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	Sem alimentação
Temperatura	24 ± 2 ° C

Requisitos	Condições
Fotoperíodo	16 h C: 8 h E
Aeração	Ausente
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	4,5 a 6 mg/L OD, pH 7,6 - 8,1
Efeito observado	Mortalidade das fêmeas
Expressão do resultado	CL ₅₀

- Ensaio de toxicidade crônica com amostra ambiental (sedimento)

O ensaio de toxicidade crônica consiste na avaliação da toxicidade de uma amostra de sedimento do ambiente, onde 10 fêmeas ovadas são expostas ao sedimento bruto por 10 dias e sua reprodução é avaliada (n. de prole / fêmea). Abaixo seguem os pontos para o ensaio:

- Preencher os frascos de cintilação com 2 mL ou 0,5 cm de sedimento controle ou ambiental por volta de 12 h antes do ensaio;
- Como sedimento controle, usa-se sedimento de local referência (não poluído), ou areia grossa previamente lavada com água da torneira e peneirada em malha de aproximadamente 1 cm. Esse sedimento controle deve ser seco à temperatura ambiente e 1 dia antes do experimento, antes de se montar os frascos, deve-se colocar a quantidade necessária de sedimento para o ensaio dentro de um papel filtro, este dentro de um funil e o funil apoiado em um recipiente qualquer, como um béquer. Adiciona-se ao sedimento água salgada natural filtrada até que a areia grossa fique encharcada, esperar que toda água em excesso seja filtrada e quando a filtração cessar, o sedimento já pode ser adicionado aos frascos de cintilação controle;
- Quanto ao sedimento ambiental, se ele estiver congelado, deve ser descongelado à temperatura ambiente e no escuro 24 h antes do ensaio e uma vez descongelado deve ser adicionado aos frascos de cintilação;
- Após a adição do sedimento colocar 15 mL de água na salinidade 17 previamente autoclavada;
- Os frascos devem ser montados para os ensaios 12 h antes do mesmo para que o sedimento fique bem decantado;
- Os frascos devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- O ensaio deve ser realizado em quadruplicata, com 10 animais por frasco (4 controles + 4 réplicas de cada amostra ambiental – o sedimento é testado bruto), no entanto, monta-se uma réplica adicional para medição dos parâmetros abióticos: oxigênio dissolvido (OD), salinidade inicial, pH, temperatura e condutividade, apenas para o início do experimento, pois as medidas destes parâmetros ao final do ensaio devem ser feitas em uma das réplicas de cada grupo experimental (controle, amostra ambiental 1, amostra ambiental 2, etc.);
- Para o início dos ensaios, exemplares de fêmeas ovadas de *Nitokra sp* devem ser triadas e adicionadas nos frascos uma a uma (fazer a triagem com auxílio de caixa de luz e lupa);

- Adiciona-se 0,1 mL de alimento (ração preparada – item 3.4) apenas no 1o dia do ensaio, e tampa-se os frascos com parafilme furado com agulha fina;
- O teste tem duração de 10 dias e as condições abióticas são: 16 h C: 8 h E, e temperatura 24 ± 2o C e sem aeração;

O Quadro 38 apresenta um resumo das condições do ensaio com amostra ambiental;

- No 10o dia de ensaio, antes de finalizar, deve-se em 1 das réplicas de cada tratamento medir os parâmetros: oxigênio dissolvido (OD), salinidade, pH, temperatura e condutividade;
- Após, deve ser adicionado 0,5 mL de Rosa de Bengala 4% dissolvido em formaldeído a 10 % (coração e fixação), tampar o frasco e agitar levemente. Deixar o material em repouso por, pelo menos, 48 h antes da análise do ensaio;
- Para análise do material, o conteúdo do frasco (sedimento e água, agora corados) pode ser peneirado e malha de 0,45 µm e o que ficar na peneira ser contado em lupa, mas essa filtragem é opcional. Os organismos devem ser identificados como adultos (fêmeas) e prole (náuplios e copepoditos);
- Conferir se não ficou nenhum organismo no filtrado, filtrando-o novamente em malha de 0,45 µm. Após descartar o filtrado no descarte de resíduos;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 38. Resumo dos requisitos para o ensaio com amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Frasco de cintilação de 20 mL
Ensaio	Estático – sem renovação do meio
Duração do ensaio	10 dias
Organismo-teste	Fêmeas adultas ovadas – <i>Nitokra</i> sp
Meio do ensaio	Água processada autoclavada na salinidade 17 + sedimento
Tratamentos	Controle + amostra ambiental de sedimento bruto
Sedimento	0,5 cm ou 2 mL por frasco
Volume final de água por frasco	15 mL – adicionar depois do sedimento e aguardar 12 h antes de começar o ensaio para sedimentação do material no frasco
Número de Réplicas	4 réplicas de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	0,1 mL de ração no 1º dia do ensaio
Temperatura	24 ± 2º C
Fotoperíodo	16 h C: 8 h E
Aeração	Ausente

Requisitos	Condições
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	4,5 a 6 mg/L OD, pH 7,6 - 8,1
Fixação do material ao fim do ensaio	2 mL de Rosa de Bengala 4% dissolvido em formaldeído 10 % por no mínimo 48 h
Efeito observado	Número de fêmeas / prole
Expressão do resultado	Tóxico ou não tóxico em relação ao controle – aplicar teste estatístico (ex. ANOVA)

Figura 9. Fêmea ovada e não ovada.

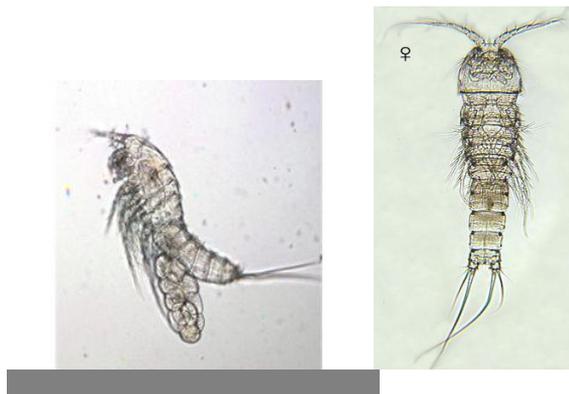
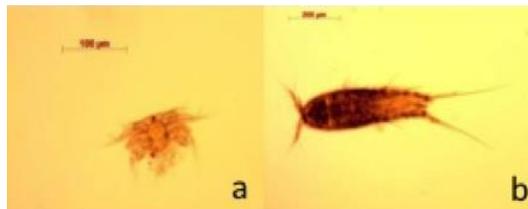


Figura 10. Náuplio (a) e copepodito (b).



I) RRDM - Procedimento Operacional Padrão (POP) – N. 12: Manutenção e ensaio ecotoxicológico com *Hyalella* spp

- Descrição e aplicação

Este documento apresenta o procedimento operacional padrão (POP) para a manutenção do cultivo do anfípoda *Hyalella* sp e realização de ensaios com substância referência e amostra ambiental. A base deste documento é a norma da ABNT NBR 15470, segunda edição de 25 de novembro de 2013, que avalia a toxicidade aguda e crônica de sedimento em *Hyalella* spp.

O método do ensaio consiste na exposição de jovens de *Hyalella* spp à amostra de sedimento ambiental ou contaminado, durante um período de 10 dias em sistema semiestático. A toxicidade é

determinada pela letalidade e/ou inibição do crescimento dos organismos-teste, sob as condições de ensaio.

- Material e equipamentos

- Balança analítica;
 - Balão volumétrico;
 - Medidor de oxigênio dissolvido;
 - Medidor de condutividade;
 - Medidor de pH;
 - Pipeta graduada, volumétrica ou micropipeta;
 - Pipeta ou conta-gotas com diâmetro adequado para manuseio dos organismos;
 - Proveta;
 - Recipiente-teste;
 - Termômetro;
 - Incubadora ou sala com controlador de fotoperíodo e de temperatura;
 - Cloreto de sódio (NaCl);
 - Pinças ou um instrumento similar;
 - Incubadora ou sala climatizada com capacidade para manter temperatura controlada entre 22° C e 26 °C;
 - Ração de peixe;
 - Polivitamínico Centrum;
 - Fermento biológico;
 - Óleo de prímula;
 - Substrato;
 - Lupa;
 - Caixa de luz;
 - Aeração;
- Material biológico

Os organismos utilizados nos ensaios são jovens de *Hyalella* spp com idade de 7 a 14 dias (Figura 11 e Figura 12). Para obtenção dos jovens é necessário manter organismos adultos em reprodução. Um neonato demora em torno de 40 dias para atingir a fase adulta.

Figura 11. Indivíduo fêmea com aproximadamente 2,5 mm de tamanho corpóreo total.



Figura 12. Indivíduo macho com aproximadamente 3 mm de tamanho corpóreo total.



- Reagentes e soluções

- Água para diluição e manutenção: água natural da torneira filtrada (malha 60 e 80 μm) e decolorada (aerada por 48 h) com pH entre 7,0 e 7,6, dureza total entre 40 mg CaCO_3/L e 48 mg CaCO_3/L , condutividade entre 190 a 250 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L. Deve ser obtida logo antes de seu uso.

- Sedimento: como sedimento controle deve ser utilizado areia grossa previamente lavada. Remover os organismos e as partículas > 1 cm, utilizando pinças ou um instrumento similar. Não é recomendado peneirar o sedimento.

- Soluções-testes: referem-se aos diferentes tratamentos seja com amostra ambiental ou substância referência.

- Cultivo

- Condições de uso do material de cultivo

- Qualquer material que venha a entrar em contato com o cultivo deve ser feito de vidro ou outro material quimicamente inerte. Tubos de ensaio, béqueres e Erlenmeyers podem ser utilizados, havendo padronização no uso (mesmo tamanho/volume, material e fabricante).

➤ O material deve ser lavado antes do uso, de acordo com procedimentos laboratoriais adequados, descritos no Procedimento Operacional Padrão nº 01.

➤ Os recipientes lavados devem ser tampados para evitar a entrada de poeira.

- Meio de cultivo (água processada)

➤ Encher recipiente plástico com água da torneira e colocar aeração forte (já tem disponível do Biotério Aquático do ICB-FURG, pois faz parte da rotina deste biotério aerar água para os cultivos). A água deve ser aerada por, no mínimo, 48 h antes de ser usada para eliminação do cloro. A água deve estar nas seguintes condições: pH entre 7,0 e 7,6, dureza total entre 40 mg CaCO₃/L e 48 mg CaCO₃/L, condutividade entre 190 a 250 µS/cm e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L.

- Montagem e manutenção do cultivo

➤ Indivíduos adultos e jovens devem ser acomodados separadamente em aquários de vidro ou de plástico com alta superfície de fundo;

➤ Os organismos devem ser separados um a um com uso de pipeta plástica cortada na ponta. Para facilitar essa separação, os organismos do cultivo podem ser concentrados, filtrando-se o meio em malha de 145 a 300 µm;

➤ Uma vez por semana fazer a troca total do meio (manutenção semanal). No momento da troca, separar as fêmeas dos jovens. Os jovens devem ser acomodados em outro recipiente e o mesmo deve ser datado. Caso seja só para o cultivo, sem a necessidade de ensaio, jovens de diferentes idades podem ser misturados num aquário para compor nova matriz reprodutora (início de novo cultivo);

➤ Aos aquários devem ser acrescentadas plantas, como a Elodea, ou pedaço de filó de nylon verde ou peto (malha de 150 a 600 µm);

➤ Manter os cultivos na proporção mínima de 1 adulto para 25 mL de água de diluição;

➤ Manter um cultivo por 3 meses, aproximadamente;

➤ Iniciar novo cultivo sempre que necessário ou quando a mortalidade for 20 % em 2 trocas de água subsequentes. Neste caso, descarta-se o cultivo com alta mortalidade. Recomenda-se iniciar um cultivo com no mínimo 100 organismos para garantir a diversidade.

➤ Registrar alterações que ocorrerem nas condições de cultivo como, por exemplo, mudança na coloração dos organismos, etc.

- Alimentação e condições abióticas do cultivo

➤ A alimentação é constituída de ração de peixe, polivitamínico (Centrum®) e adicional de espirulina. Para tanto colocar 10 g de ração comercial de peixe em 1 L de água de diluição e deixar aerando por uma semana. No final deste período, esperar decantar por 1 h e retirar o sobrenadante.

O sobrenadante deve ser filtrado em malha de 45 µm. Esta solução pode ser congelada em alíquotas menores;

- Separadamente, acrescentar fermento biológico diluído na proporção de 0,5 g em 100 mL de água de diluição e agitar até a dissolução total;
- Misturar em proporção iguais (1:1) as 2 soluções acima (ração de peixe e fermento) e adicionar uma capsula de Centrum® macerada. Agitar por 15 mim;
- Deixar decantar, separar o sobrenadante e filtrar em malha de 45 µm;
- Acrescentar 0,1 mL de óleo de prímula a cada 200 mL de ração composta;
- A mistura da solução de ração com fermento e os outros aditivos deve ser feita 1 vez a cada 15 dias e armazenada em geladeira.
- Os cultivos devem receber alimentação na proporção de 25 µL por organismos, diariamente e às sextas-feiras colocar o dobro;
- Adicionar uma pitada de espirulina 500 mg (Naturlife®) em cada aquário 3 vezes por semana;
- Os cultivos devem ser mantidos em sala climatizada ou em incubadora (câmara de germinação) com fotoperíodo ajustado para 12C: 12E, e temperatura 24 ± 2o C.

- Ensaio de toxicidade com substância de referência

- Uma semana antes da realização do ensaio, retirar os organismos jovens (0 a 7 dias) de um cultivo adulto e reservar para outro recipiente;
- Verificar se o número de jovens obtidos dos cultivos de adultos é suficiente para realização do ensaio. Se não for as alternativas são: diminuir o número de organismos expostos em cada réplica de 10 para 5, e/ou verificar presença de jovens nos dias subsequentes ao 7o dia no mesmo cultivo;
- Verificar a sobrevivência do lote de jovens separados logo antes do ensaio, sob as mesmas condições de cultivo. Caso a mortalidade seja inferior ou igual a 20 %, os organismos podem ser utilizados nos ensaios. Registrar esse dado na folha de registro;
- O ensaio com substância de referência é realizado em água, sem necessidade de sedimento;
- As substâncias referencias indicadas são KCl ou NaCl;
- No caso de se usar o KCl como substância referência, considerar a seguinte faixa de concentração de exposição: 100, 168, 284, 369 e 480 mg/L. No caso, de usar o NaCl como substância referência, considerar a faixa de concentração: 0,8, 1,2, 1,8, 2,7, 4,0 g/L de NaCl. Os Quadro 39 e Quadro 40 mostram o cálculo para solução-estoque a partir do NaCl e exemplo de preparo de soluções-teste, respectivamente.

Quadro 39. Cálculo para solução-estoque a ser usada no ensaio com substância referência.

Reagente	Quantidade (g)	Preparo
NaCl Para solução de 10 g/L	10 g	Dissolver em água de diluição e aferir o volume em balão volumétrico para 1 L

Fazer a solução previamente a cada ensaio.

Quadro 40. Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com substância referencia

Solução-teste (g/L)	Volume de solução-trabalho de 10 g/L de NaCl (mL)	Volume de água de diluição (mL)	Volume final para as 3 réplicas do teste (600) + Extra (200) (mL)
Controle	-	800	800
0,8	64	736	800
1,2	96	704	800
1,8	144	656	800
2,7	216	584	800
4,0	320	480	800

- Medir o oxigênio dissolvido (OD), temperatura, dureza, condutividade, pH e concentração total de amônia – das soluções no volume e 800 mL, antes de serem distribuídas nos béqueres para experimento;
- Os béqueres para o teste de referência podem ser preparados no dia em que o teste vai ocorrer. Eles devem ser devidamente identificados e a data de início do ensaio anotada;
- O ensaio com a substância de referência deve ser realizado, em triplicata, com 10 animais por frasco: são utilizadas 5 concentrações mais o controle, totalizando 18 béqueres de cada tratamento (ver Quadro 40);
- Deve-se fazer um volume de 800 mL para cada tratamento. Estes serão divididos em 3 béqueres contendo 200 mL como volume de solução-teste. Faz-se 800 mL para se ter um volume extra;
- Para o início do ensaios, exemplares jovens de *Hyaella* spp (1 a 14 dias) devem ser triados e adicionadas nos béqueres um a um (fazer a triagem com auxílio de caixa de luz e lupa) em um n de 10 organismos por béquer;
- Alimentar os organismos no início do ensaio e após 48 h. Adicional 50 µL de ração por béquer;
- Por fim, tampa-se os béqueres com parafilme furado com agulha fina ou placa de petri;

- O teste tem duração de 96 h e as condições abióticas são: 12C: 12E e temperatura $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sem aeração;
- O Quadro 41 apresenta um resumo das condições do ensaio com substância referência;
- Ao fim do ensaio (96 h de exposição), filtrar os organismos com malha de 145 μm ou coletar um a um e verificar letalidade dos jovens;
- Os animais são considerados mortos quando não há movimentação espontânea ou reação à estímulos táteis usando ponteira fina (pipeta pasteur de vidro, por exemplo). No grupo controle, a imobilização ou mortalidade não deve ultrapassar 10%;
- Avaliar as condições finais do ensaio em uma das réplicas antes ou após a retirada dos animais: oxigênio dissolvido (OD), temperatura, dureza, condutividade, pH;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio. Contar e registrar somente os organismos vivos e relativizar pelo total de organismos expostos;
- Descartar a solução que contenha NaCl na pia;
- Deixar os organismos de molho no hipoclorito antes de descartar na pia;
- Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio;
- Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio.

Quadro 41. Resumo dos requisitos para o ensaio com substância referência

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Béqueres de 500 mL
Ensaio	Estático
Duração do ensaio	96 horas
Organismo-teste	Jovens de 1 a 14 dias
Meio do ensaio	Água de diluição – água da torneira declorada
Substância referência	NaCl
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referencia
Sedimento	Ausente
Volume final de meio por béquer	200 mL
Número de Réplicas	3 réplicas de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	Início do ensaio e em 48 h com ração (50 μL por béquer com 10 organismos, 25 μL por béquer com 5 organismos)
Temperatura	$24 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Fotoperíodo	12 h C: 12 h E

Requisitos	Condições
Aeração	Branda (uso de ponteira na extremidade de mangueira de aeração)
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	pH entre 7,0 e 7,6, dureza total entre 40 mg CaCO ₃ /L e 48 mg CaCO ₃ /L, condutividade entre 190 a 250 µS/cm e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L
Efeito observado	Mortalidade dos jovens
Expressão do resultado	CL ₅₀

- Ensaio de toxicidade aguda e crônica com amostra ambiental (sedimento)

- Uma semana antes da realização do ensaio, retirar os organismos jovens (0 a 7 dias) de um cultivo adulto e reservar para outro recipiente;
- Verificar se o número de jovens obtidos dos cultivos de adultos é suficiente para realização do ensaio. Se não for as alternativas são: diminuir o número de organismos expostos em cada réplica de 10 para 5, e/ou verificar presença de jovens nos dias subsequentes ao 7o dia no mesmo cultivo;
- Verificar a sobrevivência do lote de jovens separados para o ensaio, sob as mesmas condições de cultivo. Caso a mortalidade seja inferior ou igual a 20 %, os organismos podem ser utilizados nos ensaios. Registrar esse dado na folha de registro.

- Preparo para o ensaio - Dia anterior ao ensaio com amostra ambiental

- Descongelar as amostras de sedimento em caixa térmica à temperatura ambiente (aproximadamente 25o C);
- Nomear os béqueres de acordo com as concentrações das soluções-teste para as amostras de sedimento;
- Acrescentar 100 mL de sedimento bruto (de maneira que se obtenha de 1 cm a 2 cm de altura no béquer) em 4 réplicas;
- Adicionar 200 mL de água de diluição em cada béquer devagar para evitar a suspensão do sedimento;
- Como sedimento controle, usa-se sedimento de local referencia (não poluído), ou areia grossa previamente lavada com água da torneira. Esse sedimento controle deve ser seco à temperatura ambiente e 1 dia antes do experimento, antes de se montar os frascos, deve-se colocar a quantidade necessária de sedimento para o ensaio dentro de um papel filtro, este dentro de um funil e o funil apoiado em um recipiente qualquer, como um béquer. Adiciona-se ao sedimento água de diluição até que a areia grossa fique encharcada, esperar que toda água em excedente seja filtrada e quando a filtração cessar, o sedimento já pode ser adicionado aos frascos de cintilação controle;
- Os recipientes-teste devem ser cobertos e colocados na geladeira.

- No dia do ensaio retirar os béqueres da geladeira bem cedo e aguardar que sua temperatura estabilize à temperatura ambiente.
- Retirar as amostras preparadas da geladeira para que atinjam a temperatura ambiente na hora do ensaio;
 - O ensaio deve ser mantido à temperatura de $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, com fotoperíodo de 12C:12E (ver Quadro 42);
 - Medir o oxigênio dissolvido (OD), condutividade, pH e concentração total de amônia de 1 das réplicas, antes de inserir os organismos-teste. Caso o oxigênio dissolvido esteja abaixo de 2,5 mg/L, aerar todas as réplicas da amostra até o término do ensaio, tomando-se o cuidado de medir novamente o teor de oxigênio dissolvido antes de inserir os organismos-teste;
 - Manter a aeração a aproximadamente 2 cm abaixo da superfície da água, garantindo que não ocorra ressuspensão do sedimento;
 - Adicionar 10 organismos (jovens de 1 a 14 dias) em cada recipiente-teste, um a um;
 - Durante o ensaio, renovar aproximadamente 2/3 da água de diluição no mínimo três vezes, com intervalo de, preferencialmente, 48 h a 72 h. Essa remoção deve ser muito cuidadosa para evitar a resuspensão de sedimento, pode-se usar pipetas para isso.
 - No início do ensaio e nos dias de renovação da água, alimentar os organismos-teste com 1,0 mL a 1,5 mL do alimento composto;
 - O ensaio deve ser encerrado após 10 dias;
 - Ao fim do ensaio determinar o oxigênio dissolvido, o pH e a condutividade da água do recipientes-teste;
 - Em seguida separar os organismos-teste da amostra de sedimento. Caso necessário, separar os organismos peneirando a amostra em rede com abertura de malha de 145 μm a 300 μm utilizando água de torneira;
 - Contar e registrar somente os organismos vivos e relativizar pelo total de organismos expostos. No grupo controle, a imobilização ou mortalidade não deve ultrapassar 10%;
 - Deixar os organismos de molho no hipoclorito antes de descartar na pia;
 - Caso não haja mortalidade, pode-se avaliar o crescimento dos organismos vivos de cada recipiente-teste e do controle como medida de toxicidade crônica (item f);
 - Inserir os dados do ensaio no respectivo formulário de registro do ensaio (vale para o item f);
 - Preencher relatório / planilha com resultados do ensaio (vale para o item f).

- Ensaio crônico

Quando não for observado efeito agudo (mortalidade) nos organismos-teste, pode-se proceder à avaliação do efeito crônico, pela medida do crescimento. O crescimento dos organismos pode ser determinado pela massa seca ou pela medida do comprimento.

- Massa seca

- Ao final do período de exposição (10 dias), determinar o peso seco médio de *Hyalella* spp. Para tanto, coloca-se o organismo num pedaço de papel filtro e depois pesa-o em superfície ou recipiente previamente tarado, utilizando balança analítica com carga mínima de 0,00001 g;
- Lavar os organismos-teste com água processada, de forma delicada (pode mergulhá-los em recipiente com água de diluição ou usar uma pisseta);
- Transferir os organismos-teste para recipientes previamente identificados e pesados;
- Colocar em estufa com temperatura entre 60 °C e 90 °C, durante 24 h, aproximadamente. Deixar esfriar em um dessecador e pesar em balança tarada. Repetir o procedimento de pesagem algumas vezes até que seja atingido peso constante;
- Determinar o peso seco pela diferença entre o recipiente vazio (previamente pesado) e com o organismo.

- Comprimento

- O comprimento de *Hyalella* spp pode ser determinado utilizando-se um analisador digital de imagens acoplado à lupa esteoscópica;
- Ao término do ensaio, preservar os organismos-teste de cada recipiente-teste em álcool 70 %;
- Realizar a medida dos organismos-teste, considerando desde a base da antena até a base do urossomo;
- Determinar o comprimento médio dos anfípodos;
- É recomendado que os organismos-teste sejam o mais homogêneo possível, para a avaliação do efeito crônico, com o objetivo de se evitar variações no comprimento/peso que possam afetar os resultados.

Quadro 42. Resumo dos requisitos para o ensaio com amostra ambiental.

Requisitos	Condições
Sugestão de recipiente para o ensaio	Béqueres de 500 mL
Ensaio	Semiestático – renovação de 2/3 da água superficial a cada 48 horas
Duração do ensaio	10 dias
Organismo-teste	<i>Hyalella</i> spp - jovens de 1 a 14 dias

Requisitos	Condições
Meio do ensaio	Água de diluição – água da torneira dechlorada
Tratamentos	Controle + 5 concentrações da substância referencia
Amostra ambiental	Controle + amostra ambiental de sedimento bruto
Volume final no béquer	1 a 2 cm ou 100 mL de sedimento bruto + 200 mL de água de diluição
Requisitos	Condições
Número de Réplicas	4 réplicas de cada tratamento
Número de organismos por réplica	10
Alimentação	1,0 mL a 1,5 mL de alimento composto no início e a cada renovação de água de diluição
Temperatura	24 ± 2° C
Fotoperíodo	12 h C: 12 h E
Aeração	Branda apenas 2 cm abaixo da superfície para não provocar suspensão do sedimento (uso de ponteira na extremidade de mangueira de aeração)
Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água	pH entre 7,0 e 7,6 e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L, condutividade entre 190 a 250 µS/cm
Efeito observado	Agudo - imobilidade - mortalidade dos jovens Crônico – peso e tamanho dos jovens
Expressão do resultado	Agudo - CL ₅₀ Crônico - CEO, CENO, Tóxico ou não tóxico em relação ao controle – aplicar teste estatístico (ex. ANOVA)

4.1.5. Avaliação da microbiota na água, sedimentos e corais

As análises da microbiota total em amostras de água, sedimentos e associada aos corais serão realizadas através da extração do DNA total, utilizando o PowerSoil DNA isolation kit (MoBio, USA [Catalog No. 12888-50]), e posterior sequenciamento de DNA, utilizando-se sequenciadores de nova geração. As leituras geradas serão processadas utilizando o programa Mothur v.1.33. A análise das sequências obtidas permitirá a avaliação do core microbiano e os microrganismos presentes nas diferentes amostras, nos diferentes pontos e nos diferentes tempos de coleta, correlacionando estatisticamente os resultados de diversidade microbiana obtidos com as demais análises realizadas no programa de monitoramento, com concomitante análise de possíveis impactos que estejam presentes em pontos de coleta ao longo do tempo. Essa avaliação permitirá não apenas indicar possíveis alterações ambientais temporais e/ou pontuais, como ainda apontar bioindicadores microbianos específicos da presença de sedimentos e/ou de impactos nas diferentes áreas amostradas, que podem ser rastreados em áreas adjacentes.

4.1.6. Análises de biomarcadores em amostras de invertebrados e peixes

Biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente e podem ser mensuradas em nível molecular, celular e fisiológico (Walker et al., 1996). Portanto, os biomarcadores selecionados para um programa de monitoramento ambiental devem detectar a exposição do organismo aos contaminantes através de qualquer alteração biológica mensurável (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude de resposta do organismo aos contaminantes (biomarcadores de efeito). Assim, os biomarcadores serão analisados de forma seletiva nas amostras de invertebrados e peixes coletados no presente programa de monitoramento, considerando-se os potenciais efeitos biológicos dos metais (desequilíbrio iônico e osmótico, inibição enzimática, oxidação de biomoléculas, danos morfológicos e desequilíbrio endócrino) nos respectivos tecidos e organismos a serem analisados, bem como a quantidade de amostra disponível para a realização das análises em questão e os resultados já obtidos nas 5 expedições de pesquisa e monitoramento ecotoxicológico promovidas pelo ICMBio (janeiro/2016 - fevereiro/2018) na foz do Rio Doce e região costeira adjacente. Os biomarcadores a serem analisados nas respectivas amostras de tecidos e organismos coletados no presente programa de monitoramento ambiental encontram-se listados abaixo (Quadro 43).

Quadro 43. Lista dos biomarcadores a serem analisados nas amostras de organismos coletados nas diferentes áreas de monitoramento.

AMOSTRA	BIOMARCADOR
Fitoplâncton	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Zooplâncton	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Composição iônica corporal (efeito)
Larvas de quironomídeos	Concentração de metalotioneínas (exposição) Composição iônica corporal (efeito) Atividade da Na,K-ATPase (efeito)
Girinos de anfíbios	Concentração de metalotioneínas (exposição) Composição iônica corporal (efeito) Atividade da Na,K-ATPase (efeito)
Poliquetos, anfípodos, isópodos e moluscos	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Hemolinfa de camarões dulcícolas e estuarinos	Composição iônica hemolinfática (efeito) Danos de DNA (efeito)
Hemolinfa de camarões marinhos e de caranguejos de manguezais e de praias.	Danos de DNA (efeito)
Brânquias de camarões dulcícolas e estuarinos	Atividade da Na,K-ATPase (efeito) Peroxidação lipídica (efeito)
Brânquias de camarões marinhos e de caranguejos de manguezais e de praias	Peroxidação lipídica (efeito)

AMOSTRA	BIOMARCADOR
Hepatopâncreas de camarões (dulcícolas, estuarinos e marinhos) e caranguejos (manguezais e praias)	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito)
Sangue de peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Composição iônica plasmática (efeito) Danos de DNA (efeito) Desreguladores endócrinos (efeito)
Brânquias de peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Atividade de enzimas antioxidantes (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos (efeito)
Fígado de peixes (dulcícolas, estuarinos e marinhos)	Concentração de metalotioneínas (exposição) Peroxidação lipídica (efeito) Atividade de enzimas antioxidantes (efeito) Atividade de enzimas do metabolismo energético (efeito) Danos morfológicos

As metodologias a serem empregadas para as análises dos biomarcadores encontram-se descritas abaixo. Devido ao grande número de amostras a serem analisadas para avaliação dos biomarcadores, para fins de praticidade e rapidez na realização destas análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, foi proposto no Plano de Trabalho Detalhado do Anexo 1 apresentado pela RRDM à Fundação RENOVA e aprovado pela Câmara Técnica de biodiversidade (CTBio) que, sempre que possível, serão utilizados kits comerciais de reagentes específicos que utilizem metodologia semelhante àquelas descritas no Anexo 1 do TR4 para a determinação dos respectivos biomarcadores.

- Concentração de metalotioneínas

A determinação da concentração de metalotioneínas será realizada conforme descrito por Viarengo et al. (1997). A amostra será homogeneizada e centrifugada (6.000 xg) durante 10 min. O sobrenadante será descartado e o precipitado será homogeneizado com 1 mL de etanol 87% e clorofórmio 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20 mM). A solução resultante será centrifugada a 6.000 xg durante 10 min. O sobrenadante será novamente descartado e o novo precipitado obtido será homogeneizado em 150 µL de NaCl (250 mM) e serão adicionados posteriormente 150 µL de solução de EDTA (4 mM) e HCl (1 N). A seguir, 100 µL de cada amostra (em duplicata) serão adicionadas a 1,4 mL de solução de DTNB preparada em um tampão (pH 8,0) contendo Na₂HPO₄.7H₂O (200 mM), NaCl (2 M) e DTNB (0,43 mM). Após nova centrifugação a 3.000 xg por 5 min, 350 µL do sobrenadante obtido a partir de cada amostra serão então transferidos, em duplicata, para as poças de uma microplaca. A leitura de absorbância (405 nm) será feita em espectrofotômetro de microplacas. Os resultados serão expressos em µmol GSH/g de peso úmido de tecido. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (Fish Metallothionein ELISA Kit, MyBiosource, USA [Cat.No: MBS038414]),

cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplacas cujos poços são revestidos com o anticorpo purificado de MT de peixes.

- Composição iônica corporal, hemolinfática ou plasmática

Para a determinação da composição iônica corporal, os microinvertebrados serão coletados, rapidamente (30 s) lavados em água tipo MilliQ, pesados, anestesiados e eutanasiados. Após 96 h de secagem em estufa (70 °C), será determinado o peso seco do material digerido e este digerido em ácido nítrico 65% (SupraPur, Merck). Após completa digestão, as amostras serão apropriadamente diluídas para a análise da composição iônica (Ca, K, Mg e Na), as quais serão determinadas por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama. Por sua vez, a concentração de cloretos será analisada pelo método de formação de cianeto férrico de enxofre. Os resultados serão expressos em mg/g de peso úmido. No que se refere à composição iônica hemolinfática e plasmática, esta será analisada nas amostras de hemolinfa (crustáceos) e sangue (peixes) que foram coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As análises dos íons (Ca, K, Mg, Na e Cl) serão realizadas conforme descrito para a análise da composição corporal.

- Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

As amostras de material biológico para a determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase serão preparadas com base nos procedimentos descritos por Péqueux e Chapelle (1982). As amostras, coletadas conforme descrito acima, serão homogeneizadas num meio contendo 1 mL de tampão SI (sacarose - Imidazol em pH 7,6) e mantidas em banho de gelo. Após serão centrifugadas a 5.000 rpm e a 5°C, por 5 min. O sobrenadante obtido será coletado para determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, a qual será determinada utilizando-se um método colorimétrico. Para tal, serão usados 100 µL do sobrenadante do homogeneizado, onde serão adicionados 2,5 mL de uma solução salina A contendo 77 mM de NaCl; 20 mM de KCl; 6 mM de MgCl₂ e 3 mM de ATP. O pH da solução será ajustado a 7,6 com tampão Tris-HCl 0,1 mM. As amostras serão incubadas durante 60 min a 25°C, no escuro e a leitura será feita a 620 nm. A mesma reação será realizada com 100 µL de sobrenadante e 2,5 mL de uma solução salina B contendo 83 mM de NaCl; 6 mM de MgCl₂, 3 mM de ATP e 1 mM de ouabaína. Ambas as reações serão mantidas por 1 h, quando então serão inibidas pela adição de ácido tricloroacético 50%. A quantidade de fósforo produzido em cada reação será determinada utilizando-se um kit de reagentes específicos para a determinação do fósforo. A diferença na produção de fósforo entre as duas reações realizadas acima será então considerada como sendo aquela atribuída à atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. A concentração da proteína no homogeneizado será determinada colorimetricamente, com base no método de Bradford, usando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade da enzima será então expressa em mmoles Pi/mg proteína/h. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes (Na⁺/K⁺ ATPase Assay Kit, fornecido pela MyBiosource, USA, [MBS8243226]), cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

- Atividade de enzimas envolvidas na calcificação

A preparação das amostras para análise dos parâmetros de calcificação será realizada macerando-se as amostras em nitrogênio líquido e separando-as em alíquotas de 150-200 mg. Para cada análise, as amostras serão homogeneizadas em tampão específico (1:1; peso/volume) para cada ensaio, com o auxílio de um sonificador. As amostras homogeneizadas serão então centrifugadas (10.000 xg, 20 min, 4°C) e o sobrenadante coletado para as análises, sendo imediatamente utilizado para as medidas de atividade enzimática (Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase e anidrase carbônica). A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas será realizada baseando-se no método de Bradford. A determinação da atividade da anidrase carbônica será realizada medindo-se a redução de pH associada à catálise da hidratação do CO₂, com a correspondente liberação de H⁺ (Henry, 1991). O tampão utilizado para homogeneização das amostras será constituído de Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF 1 mM) e ditritioitreitol (DTT 1 mM). Para isso, 15 µL do homogeneizado serão adicionados a 3 mL de uma solução de reação composta por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). Em seguida, serão adicionados 280 µL de substrato (água destilada saturada com CO₂) e o pH registrado a cada 5s, durante 30s, com o auxílio de um pHmetro de bancada. Paralelamente, serão realizadas determinações do “branco de reação”, onde 15 µL do tampão de homogeneização serão adicionados à solução de reação e ao substrato. Será utilizado o modelo de regressão linear (variável dependente: pH, variável independente: tempo) para determinar a declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos nos homogeneizados será a taxa de reação catalisada, enquanto a média dos dados obtidos nos brancos indicará a taxa da reação não catalisada. Os resultados serão normalizados considerando a quantidade de proteínas nas amostras e expressos em unidades de anidrase carbônica/mg proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, será utilizado um kit comercial de reagentes (Fish Carbonic Anhydrase ELISA Kit, fornecido pela MyBiosource, [MBS032136], USA), cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

A determinação das atividades da Ca²⁺-ATPase e da Mg²⁺-ATPase será realizada utilizando-se o método descrito por Vajreswari et al. (1983), com modificações. O homogeneizado da amostra será preparado utilizando-se tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado será centrifugado (20 min, 10.000 xg, 4°C) e 20 µL do sobrenadante serão utilizados para a análise. O meio de reação utilizado na análise da atividade da Ca²⁺-ATPase será composto por NaCl (189 mM), MgCl₂ (5 mM), CaCl₂ (5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação será realizada a 30°C, por 30 min. Por sua vez, o meio de reação utilizado na análise da atividade da Mg²⁺-ATPase será composto por NaCl (189 mM), MgCl₂ (5 mM), EGTA (0.2 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6). A incubação da reação será realizada a 30°C, por 30 min. No início da incubação, ATP (3 mM) e ouabaína (1mM) serão adicionados aos meios de reação. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberada pela atividade das enzimas no meio de reação será determinada utilizando-se o método colorimétrico (630 nm). Os resultados serão normalizados com

base na quantidade de proteínas totais presentes nos homogeneizados e serão expressos em mM Pi/mg proteína/min. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, será utilizado um kit comercial de reagentes (General Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase Assay Kit, fornecido pela MyBiosource [MBS8243201]), cujo princípio de análise também utiliza um método espectrofotométrico em microplaca.

- Atividades de enzimas do metabolismo energético

As atividades da lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) serão analisadas em homogeneizados das amostras das brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima. Os homogeneizados das amostras de brânquias e fígado serão realizados por maceração mecânica em mistura contendo 0,9% de NaCl e 0,05% de Triton x 100. Após centrifugação, o sobrenadante obtido será utilizado para as análises das atividades da LDH e MDH. A avaliação da atividade da LDH será realizada pela mistura de solução de piruvato de sódio (1 mM), KCl (100 mM), tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) e NADH (250 µM) a uma alíquota do sobrenadante de cada homogeneizado de brânquia ou fígado. Para a determinação da atividade da MDH, serão adicionados à alíquota do sobrenadante dos homogeneizados uma solução de ácido oxaloacético (0,4 mM), MgCl₂ (20 mM), NADH (150 µM) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Os procedimentos para as análises enzimáticas serão aqueles descritos por Thuesen et al. (2005) e Childress e Somero (1979) para LDH e MDH, respectivamente, e adaptada por Ribeiro et al. (2015). A taxa de oxidação de NADH na reação catalisada pelas enzimas em análise será determinada por espectrofotometria UV em 340 nm. A dosagem de proteínas totais dos homogeneizados será realizada pelo método de Bradford. As atividades enzimáticas serão expressas em U/mg de proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderão ser utilizados kits comerciais de reagentes (Desidrogenase Láctica, LDH UV (K014) fornecido pela Bioclin, Brasil), cujos princípios de análise também estão baseados em métodos espectrofotométricos.

- Atividades de enzimas antioxidantes

As atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) serão analisadas nos homogeneizados de tecidos preparados conforme descrito no item "Atividades de enzimas do metabolismo energético". A atividade da CAT será determinada através da análise do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), conforme descrito por Aebi (1984). Por sua vez, a atividade da SOD será analisada medindo-se o grau de redução do citocromo C, conforme descrito por McCord e Fridovich (1969). A dosagem de proteínas dos homogeneizados será realizada pelo método de Bradford. As atividades da CAT e da SOD serão expressas em U/mg de proteína. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderão ser utilizados kits comerciais de reagentes, cujos princípios de análise também estão baseados em métodos espectrofotométricos em microplaca (Superoxide Dismutase Assay Kit [7500-100-K] fornecidos pela Trevigen, USA), seguindo recomendações técnicas da fabricante.

- Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) será determinada nas amostras do material biológico utilizando-se o método fluorescente baseado nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Oakes e van Der Kraak (2003). Este método quantifica os danos em lipídios por meio da reação do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação ocorre em condições de acidez e alta temperatura (95 °C) cromógeno fluorescente. Para serem analisadas, as amostras serão homogeneizadas (1:9 ; peso : volume) utilizando-se uma solução tampão específica. A fluorescência gerada (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) será medida utilizando com base em uma curva construída com soluções padrões de tetrametoxipropano (TMP) que após hidrólise gera MDA. Os resultados serão normalizados em relação ao conteúdo de proteínas nas amostras, o qual será determinado utilizando expressos em nmol MDA/mg proteína. As análises de lipoperoxidação pelo método TBARS poderão ser realizadas utilizando kits importados de alta confiabilidade (TBARS - TCA Method Assay Kit [No.700870] Kayman Chemical, USA).

- Oxidação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas serão analisados utilizando-se o método descrito por Dalle-Done et al. (2003). Portanto, para quantificar a concentração de proteínas carboniladas nas amostras biológicas serão utilizadas as técnicas de eletroforese unidimensional e de ensaio imunológico por "Western blotting". Neste caso, a detecção das proteínas carboniladas envolve a derivatização do grupamento carbonil com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), a qual leva à formação de um produto estável, a 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP). Antes da derivatização, o conteúdo de proteínas da amostra será padronizada em 0,2 mg/ml de homogenizado, visando normalizar as amostras para a realização do ensaio de eletroforese (SDS-PAGE) e "Western blotting". No processo de derivatização, as proteínas reagirão com DNPH em uma solução contendo 12% SDS e uma solução de DNPH/TFA [20 mM DNPH em 20% (v/v) de TFA (ácido trifluoroacético)]. Adicionalmente, três amostras servirão como controle positivo, as quais conterão 1, 2 e 4 mM de H₂O₂ para induzir o dano oxidativo na amostra. Após incubação por 15 min na temperatura ambiente, a mistura de reação será neutralizada com uma solução 2M de Tris-Base contendo 30% de gliceraldeído. Para cada amostra, as proteínas derivatizadas com DNPH serão separadas para eletroforese unidimensional em gel de poliácridamida 12% (1D SDS-PAGE), eletroprecipitadas em membranas de PVDF e submetidas ao ensaio imunológico para determinação do conteúdo de proteínas carboniladas com um anticorpo anti-DNP (Invitrogen, EUA). As bandas obtidas serão visualizadas utilizando-se um kit de reagentes para imunodeteção colorimétrica (Invitrogen, EUA). As densidades das bandas obtidas serão analisadas para cada amostra após escaneamento da membrana de PVDF. Os resultados serão expressos em pixels de densidade ótica. Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, poderá ser utilizado um kit comercial de reagentes, cujo princípio de análise de proteínas oxidadas é semelhante àquele descrito acima, porém que utiliza um método espectrofotométrico em microplaca (OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay, fornecido pela MyBioSource [MBS 168032]), seguindo as especificações técnicas da fabricante.

- Danos no DNA

O Anexo 1 do TR4 prevê cinco metodologias diferentes para avaliação de danos à molécula de DNA (detecção de sítios AP através de kit comercial, ensaio do vermelho neutro, teste de micronúcleo, ensaio cometa, e detecção de caspases por imunohistoquímica). Considerando que todas estas metodologias estão associadas ao mesmo biomarcador de efeito (danos ao DNA) e, portanto, fornecem dados semelhantes, foi proposto no Plano de Trabalho Detalhado do Anexo 1 apresentado pela RRDM à Fundação RENOVA que as amostras de hemolinfa de crustáceos e sangue de peixes sejam testadas através de duas destas técnicas, principalmente em função da disponibilidade de material coletado em campo. Cabe ressaltar que esta abordagem permite a avaliação de danos ao material genético, conforme originalmente proposto no Anexo 1 do TR4, mesmo em condições limitantes de quantidade de material biológico disponível e de processamento deste material campo. Cabe salientar ainda que esta abordagem também viabiliza a possibilidade de comparação dos resultados obtidos com diferentes técnicas de análise de dano ao DNA nas amostras coletadas durante o monitoramento. Portanto, conforme foi aprovado pelo CTBio, as amostras de hemolinfa de crustáceos e sangue de peixes serão testadas através de apenas duas metodologias para avaliação de danos à molécula de DNA, a saber: (1) detecção de sítios AP através de kit comercial; e (2) teste de micronúcleo.

Para a análise de danos oxidativos no material genético, o DNA genômico poderá ser isolado utilizando-se um kit de reagentes para isolamento de DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, [A1120], USA) conformes recomendações da fabricante (vide Anexo XIII). Por sua vez, a análise de danos oxidativos no DNA será realizada com base na identificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP). Os sítios AP serão medidos utilizando-se uma sonda capaz de reagir com o grupo aldeído destes sítios, a qual será detectada por colorimetria (450 nm) em uma leitora de microplacas. Para tal, será utilizado um kit de reagentes de detecção de dano de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (DNA Damage Quantification Colorimetric Kit, [K253-25], Biovision, USA). Os resultados serão expressos em sítios AP/mg de proteína, considerando a concentração de proteínas nas amostras, a qual será determinada utilizando-se o método de Bradford.

Para a avaliação do dano no material genético através do ensaio de micronúcleo serão utilizadas as amostras de hemolinfa dos crustáceos e de sangue dos peixes coletadas durante o monitoramento, conforme descrito acima. As amostras serão coletadas com seringas (1 mL), munidas de agulhas 21 gauge, para evitar danos aos hemócitos. As amostras serão transferidas para tubos siliconizados, que serão dispostos em microcentrífuga (1.000 rpm, por 5 min), com retirada de 50 µL com micropipeta, colocada junto ao fundo do tubo. Este volume de material será gotejado na lateral da lâmina, sendo então espalhado por esfregaço com outra lâmina. O procedimento será realizado individualmente, com a obtenção de três lâminas/indivíduo, as quais serão secas ao ar e fixadas com solução de Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético), por cerca de 20 min, com nova secagem à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão coradas com solução de Giemsa 2%, preparada em tampão fosfato pH 8,0 (Na₂HPO₄ + KH₂PO₄), também por 20 min. Após este

procedimento, as lâminas serão lavadas com água deionizada, secas ao ar e com adesão de lamínulas com Entellan® (Merck). Posteriormente, as lâminas serão examinadas sob microscópio óptico comum, integrado a um sistema de análise de imagens por computador, com contagem das células micronucleadas pelo programa KS300® (Carl Zeiss, Alemanha) ou alternativamente o software livre ImageJ. As três lâminas de cada indivíduo serão avaliadas em aumento de 1.000X, com avaliação de 1.000 hemócitos em cada lâmina, sendo então quantificado o número de células micronucleadas por 1.000 células analisadas (MN‰).

- Danos morfológicos

Efeitos histopatológicos serão avaliados nas amostras de brânquias e fígado dos peixes coletados durante o monitoramento, conforme descrito acima. Fragmentos de fígado e brânquias serão imersos em solução alcóolica de Bouin por até 24 h, a 4 °C, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. O material será seccionado em micrótomo rotativo. As secções obtidas serão coradas com hematoxilina/eosina e tricômio de Mallory. Algumas lâminas serão submetidas à técnica de coloração PAS, sendo para isso banhadas em ácido periódico 1% por 10 min, lavadas em água destilada e mergulhadas em Reativo de Schiff por 20 min. Em seguida, será realizada uma nova lavagem em água corrente por 10 min, seguida de coloração com hematoxilina de Harris por 3 min, lavagens em água destilada, desidratação e montagem. Este material será utilizado para análises histopatológicas, onde serão avaliados: áreas de necrose, esteatose, gotículas lipídicas, colestase, neoplasias, melanomacrófagos, alterações nucleares, congestão hemorrágica, infiltrados inflamatórios, fibrose e aneurisma lamelar. Considerando o reduzido número de amostras estabelecido originalmente no Anexo 1 do TR4 e posteriormente pela Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, recomenda-se que as análises de ecotoxicologia reprodutiva e de histopatologias gonadais em peixes sejam realizadas posteriormente, através de um planejamento amostral específico e adequado, caso os resultados das avaliações dos estudos populacionais em peixes detectem impactos negativos na reprodução das populações de peixes estudadas ao longo do programa de monitoramento em curso.

- Biomarcadores de desregulação endócrina

As análises dos biomarcadores de desregulação endócrina contemplam vitelogenina (Vtg) e proteínas da zona radiata (Zrp) em amostras de plasma sanguíneo dos peixes coletados durante o monitoramento. O sangue total será imediatamente centrifugado em mini centrífuga por 2 min à 4700 xg após adição de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich) na proporção 1:100. O plasma isolado será imediatamente armazenado em nitrogênio líquido (-80 °C) para análise posterior.

Para fins de praticidade e rapidez na realização das análises, bem como de precisão e reprodutibilidade dos dados, será utilizado um kit comercial de reagentes (Semi-Quantitative Biomarker ELISA Component Kit For Fish Samples, Biosense Laboratories, [B00400402], Norway) seguindo instruções de protocolo do fabricante cujo princípio de análise utiliza um método espectrofotométrico em microplaca (ELISA). Considerando o reduzido número de amostras

estabelecido originalmente no Anexo 1 do TR4 e posteriormente pela Nota Técnica nº 3/2017/CTBio/DIBIO/ICMBio, recomenda-se que a determinação da razão sexual e da proporção de peixes intersexo nas amostras sejam realizadas posteriormente, através de um planejamento amostral específico e adequado, caso os resultados das avaliações dos estudos populacionais em peixes detectem impactos negativos na reprodução das populações de peixes estudadas ao longo do programa de monitoramento em curso.

4.2. ANEXO 3 - MONITORAMENTO AMBIENTAL NO RIO DOCE, ÁREA ESTUARINA E MARINHA – SISTEMA AQUÁTICO MARINHO

4.2.1. Matriz coluna d'água

a) Hidrodinâmica

- Modelagem Numérica

- Perfilagem CTD

Em laboratório, os dados obtidos pelo equipamento devem ser baixados seguindo as orientações do manual de instruções disponível no LabPoseidon. Os dados hidrográficos obtidos por um CTD serão tratados com o auxílio do software Matlab® ou com o software disponibilizado pelo próprio fabricante do equipamento. Serão separados os perfis de descida e subida dos equipamentos para cada propriedade, a fim de avaliar e minimizar o impacto da mistura vertical promovida pela descida do equipamento.

A primeira etapa do tratamento dos dados é a filtragem, na qual será utilizado um filtro de passa-baixa para eliminar as altas frequências (ruídos) dos dados obtidos pelo equipamento. Ou seja, nos dados serão detectados e retirados valores discrepantes (*spikes*) utilizando o critério de separar verticalmente os perfis em 5 m e, em cada bloco, eliminando os valores que forem superiores (inferiores) a ele mesmo somado (subtraído) de três vezes o desvio padrão do bloco. A segunda etapa de tratamento é o alinhamento dos dados, que inclui a correção da diferença entre os tempos de resposta dos sensores de condutividade e oxigênio em relação à pressão para garantir que todos os parâmetros se tratam da mesma parcela de água. A terceira etapa é a binagem, que consiste na realização de médias verticais dos dados a cada 1 dbar de coluna de água de forma que os dados fiquem equi-espaciaados verticalmente. Em seguida, os dados coletados passarão por um alisamento por janela móvel que consiste na substituição dos valores de temperatura e salinidade por uma média ponderada entre eles mesmos e os valores adjacentes. O tamanho da janela será ajustado de acordo com a profundidade de cada ponto amostral. A janela aplicada será do tipo *Hanning* cuja distribuição de peso é de caráter gaussiano, ou seja, o maior peso é atribuído ao valor central. Por fim, serão estimadas outras propriedades oceanográficas a partir da temperatura, condutividade e pressão com o auxílio do pacote de rotinas GSW Oceanographic Toolbox desenvolvido por McDougall e Barker (2011).

Após o pré-processamento descrito acima, os dados serão plotados e analisados de maneira a obter seções verticais das propriedades. Serão criados mapas horizontais das diferentes propriedades por meio de interpolação ótima, de forma a observar a distribuição das propriedades próxima à superfície e junto ao fundo, por exemplo. Perfis verticais de estações individuais e estatísticas básicas dos dados (média, desvio-padrão, variância, etc) também serão analisados de modo que se estabeleçam cenários que auxiliem na compreensão de como a dinâmica oceanográfica local condiciona o padrão de distribuição e destino final do rejeito no ambiente marinho.

- Fundeios

Um total de quatro linhas de fundeio será instalado prioritariamente na região do entorno da foz do Rio Doce em pontos específicos previamente determinados. Nelas deverão ser obtidas medidas de ondas, correntes, dados termohalinos e, no mínimo fluorescência e turbidez. A linha de fundeio deverá contemplar, pelo menos, uma medição junto ao fundo e outra próxima a superfície. Todos os equipamentos serão alimentados por baterias internas e o armazenamento dos dados também será interno, não havendo transmissão de dados em tempo real. As linhas de fundeio terão basicamente uma boia na superfície conectada a uma poita por uma sequência de correntes e manilhas de aço. A tonelagem da poita será decidida conforme o empuxo da boia de superfície. As medições de ondas e correntes serão realizadas por um equipamento perfilador acústico colocado próximo ao fundo numa estrutura de sustentação de aço inoxidável fixada à poita. O equipamento acústico será programado conforme as instruções do manual de usuário utilizando o software fornecido pela empresa, e os dados serão submetidos às seguintes análises, abaixo discretizadas: (a) análises estatísticas; (b) análises harmônicas; (c) análises espectrais; (d) análises de ondaleta (wavelet), e; (e) análises EOF (Empiric orthogonal function).

- Parâmetros estatísticos

Nos dados de nível e de correntes serão realizadas análises estatísticas básicas, tais como, cálculos da média, desvio padrão, variância, etc. Para tanto, serão utilizados os pacotes de rotinas disponíveis no ambiente Matlab (Descriptive Statistics – Basic Statistics).

- Análises harmônicas e previsão da maré

Neste trabalho será utilizado o pacote de rotinas T-Tide, desenvolvido por Pawlowicz et al. (2002) em linguagem Matlab®, na análise harmônica e na previsão de maré. Neste tipo de análise se parte do pressuposto que a onda de maré é constituída pelo somatório de componentes representadas por ondas senoidais, que apresentam amplitudes e fases constantes, sendo os registros das amplitudes e fases determinados a partir das oscilações do nível da água e da velocidade das correntes medidas. Este pacote de rotinas também será utilizado para a investigação do comportamento das correntes de maré da região, uma vez que estas poderão ser obtidas a partir da subtração entre os dados medidos in situ e os previstos com o programa t_predic do pacote T-Tide.

- Análises espectrais

Utilizadas para a investigação de fenômenos periódicos que resultam da superposição de ondas senoidais que apresentam períodos e amplitudes característicos (Emery; Thomson, 2001), as análises espectrais, denominadas especificamente de Transformada de Fourier, também serão utilizadas neste estudo. Pela análise de Fourier, uma série temporal é desmembrada em componentes que apresentam diferentes frequências, sendo os componentes mais significativas identificadas através de picos identificados nos espectros de energia.

Neste trabalho, análises espectrais serão utilizadas para identificação das oscilações presentes na área de estudo, sendo possível determinar quais as frequências mais energéticas que atuam no sistema e a origem destas oscilações, que poderão ser investigadas a partir da utilização da modelagem numérica.

- Análise de Ondaleta (Wavelet)

A análise de ondaleta consiste na decomposição da série temporal em tempo e frequência simultaneamente, sendo possível determinar sua variabilidade no tempo. Comparada à análise de Fourier, a análise de ondaleta capta o comportamento local do sinal, enquanto a análise de senos e cossenos, que oscilam indeterminadamente, capta apenas o comportamento global. Isso faz com que, quando comparado ao espectro de Fourier, o espectro de ondaletas seja menos afetado pelo comportamento não-estacionário de um intervalo pequeno de tempo (Torrence e Compo, 1998). Daubechies (1990) aponta que a transformada de ondaleta pode ser utilizada para a análise de séries temporais que contenham energia não estacionária de várias frequências diferentes. Para este trabalho, provavelmente, será utilizada a ondaleta de Morlet (Torrence; Compo, 1998), que permite que sejam obtidas a amplitude e a fase das oscilações.

- Empiric orthogonal function (EOF)

Para se determinar a importância relativa das componentes barotrópica e não-barotrópica do fluxo residual de correntes serão realizadas análises EOF (empiric orthogonal function) Thompson e Wallace (1998; 2000), Kutzbach (1967), Wilks (1995), Storch (1993) e Joliffe (2002).

Além disso, serão realizadas análises relacionando os diferentes parâmetros (temperatura, salinidade, correntes, fluorimetria), tanto no domínio do tempo quanto em análises espectrais cruzadas. Essas análises serão focadas (mas não limitadas) ao entendimento das diferenças entre a circulação da superfície e do fundo na região e na inter-comparação entre os dados obtidos para cada um dos pontos de fundeios.

Associadas às medições de correntes, serão realizadas medições de ondas de gravidade superficiais. O estudo das ondas se faz necessário visto que mesmo em áreas abrigadas, as ondas raramente podem ser ignoradas, uma vez que, mesmo apresentando pequenas amplitudes, estas podem ressuspender sedimentos finos em muitas áreas rasas, e assim, contribuir para a estabilidade, ou não estabilidade, ao longo do tempo (Le Hir et al., 2000). Carniello et al. (2011) apontam que em regiões costeiras, com regime de micromarés, as correntes de maré e as ondas geradas pelos ventos são os

principais responsáveis pela evolução morfológica. De acordo com Rusu et al. (2011), evidências observacionais e modelos matemáticos têm demonstrado que há uma relação crucial entre as ondas geradas pelos ventos e o sedimento em suspensão em regiões onde a maré não é suficiente para remobilizar os sedimentos, sendo que as interações entre maré e onda descrevem os padrões de erosão e deposição nestas áreas. Assim, nesta etapa do trabalho será realizada uma descrição da evolução da onda à medida que está se aproxima da linha de costa. Para tanto, inicialmente será realizada uma caracterização das ondas incidentes na região, sendo prioritariamente, realizada a classificação das ondas, determinação das frequências, cálculo das alturas médias significativas, porcentagem de ocorrência das alturas significativas, períodos médios de pico, esbeltez e direção predominante. Parâmetros estatísticos (Mediana, média, desvio padrão, variância, erro médio quadrático) serão aplicados nos resultados das análises de altura significativa, período de pico e direção principal da onda. Além disso, serão construídas rosas de direções das ondas, avaliadas as correlações entre os ventos e ondas (velocidade média dos ventos versus altura significativa das ondas e direção dos ventos e altura significativa). Análises para que se possa investigar a interação das ondas com as correntes de maré (período de pico versus velocidade) estão previstas

A divisão da dinâmica local em diferentes escalas temporais de processos oceanográficos permitirá melhor caracterizar os processos físicos que atuam na foz do Rio Doce e adjacências e avaliar a capacidade dos resultados numéricos de reproduzir os principais processos locais e regionais.

- Modelo – implementação

O modelo oceânico tridimensional ROMS (Regional Ocean Modeling System, <http://www.myroms.org>, Haidvogel et al., 2000; Marchesiello et al., 2001) será utilizado para evidenciar processos de pequena e mesoescala ao longo da plataforma continental do Espírito Santo e oceano adjacente. Duas simulações numéricas de distintas resoluções espaciais serão utilizadas. Na primeira, a resolução espacial será de $1/24^\circ$ (~4,6 km) e 40 níveis sigma. Nela serão implementadas forçantes datadas para um período de spinup. Aninhada a esta grade será utilizado o nesting do tipo one-way, a uma segunda grade numérica com resolução espacial de $1/120^\circ$ (~0,9 km) com foco sobre a plataforma do ES entre o Banco de Abrolhos e o sul do Estado. Esta segunda simulação contemplará o período agudo de chegada dos rejeitos e o período crônico subsequente. A batimetria a ser utilizada derivará dos dados do GEBCO (General Bathymetric Chart of the Oceans) com resolução espacial de 30 arco segundo. Esses dados deverão ser suavizados e complementados/ajustados com dados medidos in situ sobre a plataforma continental da região. As condições de contorno Radiation/Nudging serão impostas para os traçadores (temperatura/salinidade), bem como para as componentes baroclínicas, e as condições de Flather para as condições barotrópicas, com o modo explícito de Chapman para a superfície livre. O Nudging será aplicado em 30 pontos de contorno de cada grade, durante 5 dias nos contornos. Uma camada de esponja de 25 pontos de grade será implementada nos contornos abertos (norte, sul e leste), onde o coeficiente de viscosidade horizontal deverá ser mantido constante em $50 \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. O modelo de fechamento turbulento a ser utilizado deverá ser o Generic Length Scale (GLS vertical mixing) (Umlauf e Burchard, 2003), o qual foi introduzido ao ROMS por Warner et al.

(2005). O cisalhamento de fundo será parametrizado usando-se a lei de arrasto de fundo quadrático, com um valor de $CD = 3 \times 10^{-3}$. As forçantes atmosféricas aplicadas a ambos os experimentos serão provenientes do European Centre for Medium-Range Weather Forecasts (ERA Interim/ECMWF) o qual possui resolução espacial de $0,3^\circ$ a cada 3h, aplicado em todo o todo o domínio do modelo. As condições de contorno laterais alimentadas ao domínio de menor resolução espacial serão provenientes do modelo oceânico global HYCOM-NCODA (Hybrid Coordinate Data Assimilation-Navy Coupled Ocean Data Assimilation, Wallcraft et al. (2009)), com uma resolução horizontal de $1/12^\circ$ (~9,2 km). Os constituintes da maré que serão aplicadas às condições de contorno são provenientes do Finite Element Solution (FES2014, AVISO, 2014) que fornece informações de 34 componentes de maré, com resolução de $1/16^\circ$. Na segunda simulação numérica será avaliada a dispersão da pluma do Rio Doce tendo como base a distribuição halina na plataforma continental. A princípio, serão utilizados dados médios diárias de vazão da estação de Colatina/ES distribuídas exponencialmente ao longo da coluna d'água em um canal estuarino de distante ~90 km da foz do rio. Os resultados do modelo hidrodinâmico aliados ao da climatologia do WOA 2013 (World Ocean Atlas) também alimentarão o modelo biogeoquímico Fennel (Fennel et al., 2006a, 2008a), o qual descreve de forma simplificada o ciclo do nitrogênio com sete variáveis de estado: nitrato, amônia, fitoplâncton, zooplâncton, detritos pequenos e grandes, e clorofila-a (Fennel et al., 2006). O oxigênio dissolvido foi adicionado ao modelo original como uma variável de estado como descrito em Fennel et al. (2013). Os detalhes do modelo podem ser obtidos em Fennel et al. (2006, 2013). As constantes dos parâmetros do modelo serão mantidas como em Fennel et al. (2011, 2013). O modelo biogeoquímico Fennel foi utilizado com sucesso em estudos envolvendo o papel da plataforma continental no ciclo do nitrogênio (Fennel, 2010), nas de condições de hipoxia (Fennel et al., 2013; Fennel et al., 2016) e nos impactos do ferro na produção fitoplanctônica (Fennel et al., 2003). As variáveis biológicas como amônia, fitoplâncton, clorofila-a, zooplâncton e detritos e as concentrações de NO_3 e oxigênio dissolvido serão inicializadas com valores climatológicos de acordo com os dados globais do WOA 2013 e os dados obtidos in situ. Para simular os efeitos que a pluma do Rio Doce causa sobre o ciclo do nitrogênio na plataforma continental, serão utilizadas concentrações base de NO_3 na forçante fluvial de acordo com dados primários obtidos in situ antes da chegada da lama de rejeitos no mar. Os resultados do modelo servirão para analisar, juntamente com as imagens de satélite, os processos de ressurgência costeira com enriquecimento de nutrientes (também oriundas da descarga continental) e a floração fitoplanctônica.

No processamento dos resultados será realizada uma análise de campos e seções verticais das diferentes variáveis dos resultados numéricos (temperatura, salinidade, velocidade, etc.). Essas análises compreenderão estatísticas básicas dos diferentes campos (médias, desvio-padrão, variância, etc.), bem como a análise de campos instantâneos de condições oceanográficas, análise de eventuais padrões sazonais e variabilidade interanual. As análises serão focadas (mas não limitadas a) às condições oceanográficas de superfície e fundo da região, visando melhor compreender à dispersão e o transporte de sedimentos, nutrientes e plâncton na foz do Rio Doce. Durante as simulações numéricas serão implementados fundeios virtuais onde serão armazenados

dados horários de temperatura, salinidade, componente zonal e meridional da velocidade em diferentes profundidades e elevação da superfície do mar. Inicialmente, deverão ser contempladas as 38 estações onde já foram realizadas coletas de dados em campanhas anteriores na região, além dos pontos de fundeios descritos neste documento. Serão feitas comparações entre os resultados numéricos obtidos a partir dos fundeios virtuais com os dados in situ obtidos a partir dos cruzeiros e fundeios. As séries temporais serão decompostas em diferentes escalas temporais de maneira a poder avaliar a capacidade do modelo de reproduzir os diferentes processos que ocorrem na região, como as correntes de maré, correntes induzidas pelo vento, ressurgência, entre outros.

- Sensoriamento remoto

O sensoriamento remoto será desenvolvido em três níveis, isto é, a partir do uso de, pelo menos, dois conjuntos de imagens de satélite: temperatura da superfície do mar e cor do oceano /concentração de clorofila-a, provenientes do sensor MODIS, a bordo dos satélites Aqua e Terra. Em laboratório serão realizados a aquisição e o processamento dessas imagens (ou dados) e a união dessas informações resultará em uma avaliação da dispersão espaço-temporal da pluma de turbidez superficial e/ou da sua influência, por exemplo, na cadeia trófica marinha.

A turbidez superficial da água a uma distância mínima de um quilômetro da costa será derivada a partir de técnicas de processamento de dados de reflexão da luz (Remote Sensing Reflectance – R_{RS}) nos comprimentos de onda de 645 nm (banda da cor vermelha do espectro visível) e 859 nm (reflectância no comprimento de onda no infravermelho próximo) em ambientes marinhos de alta e baixa turbidez de acordo com (Dogliotti et al., 2015; Aurin et al., 2013). Empregar-se-á também o uso da reflectância no comprimento de onda associado à banda da cor verde do espectro visível (R_{RS} em 555 nm). Esses processamentos consistem na conversão de arquivos nível 1A de processamento em nível 2, ($L1A > L1B > L2$) utilizando o software SeaDAS, disponibilizado pelo portal OceanColor da NASA.

Os dados de R_{RS_645} e R_{RS_859} serão processados de duas formas com 250 m de resolução espacial. Na primeira, para águas consideradas mais turvas, se alterarão as bandas para detecção de aerossóis atmosféricos do infravermelho próximo para o infravermelho: 1240 e 2130 nm. Também se aplicará um filtro de remoção 3 x 3 pixels ao redor de nuvens e da costa para se reduzir interferências do tipo stray lights e se aplicará médias em 3 x 3 pixels para a remoção de ruídos provenientes dessas bandas. Para detecção de nuvens será considerado o limite de 0.018 no comprimento de onda de 2130 nm.

Na segunda, para águas consideradas menos turvas, o procedimento é semelhante ao anterior, porém assumindo-se as bandas do infravermelho próximo para a detecção de aerossóis atmosféricos: 748 e 869 nm.

Os dois produtos de R_{RS_645} e R_{RS_859} (para águas mais e menos turvas) serão mesclados baseados no limiar de $0,01 \text{ sr}^{-1}$ de R_{RS_645} processado para águas mais turvas, onde pixels com valores maiores ou iguais ao limiar nas matrizes de R_{RS_645} e R_{RS_859} processadas para águas

mais turvas, se mantém, caso contrário são substituídos pelos pixels processados para águas menos turvas.

Após isso se aplicará o modelo de estimativa de turbidez:

A turbidez será calculada para as reflectâncias de 645 nm e 859 nm. O resultado final será produzido a partir de uma nova mesclagem.

Turbidez usando a reflectância em 645 nm:

$$T_{645} = \frac{(228,1 \times R_{RS645})}{\left(1 - \left(\frac{R_{RS645}}{0,1641}\right)\right)}$$

Turbidez usando a reflectância em 859 nm:

$$T_{859} = \frac{(3078,9 \times R_{RS859})}{\left(1 - \left(\frac{R_{RS859}}{0,2112}\right)\right)}$$

T_{645} = Turbidez baseada em 645 nm em NTU

T_{859} = Turbidez baseada em 859 nm em NTU

R_{RS645} = Reflectância na banda dos 645 nm em sr^{-1}

R_{RS859} = Reflectância na banda dos 859 nm em sr^{-1}

Definição de um fator de peso:

Cada pixel terá um fator de peso entre 0 e 1. Pixels com R_{RS645} entre 0 e 0.05 sr^{-1} terão fator de peso igual a 0. Pixels com R_{RS645} maior ou igual a 0.07 sr^{-1} terão fator de peso igual a 1. Pixels com R_{RS645} com valores entre 0.05 e 0.07 sr^{-1} terão fator de peso variando de forma linear entre 0 e 1:

$$Fp (0,05 \leq R_{RS645} \leq 0,07) = (50 \times R_{RS645}) - 2,5$$

Fp = fator de peso

R_{RS645} = Reflectância na banda dos 645 nm

Tendo os três produtos - turbidez com base em 645 nm, turbidez com base em 859 nm e fator de peso - compõe-se o produto final:

$$T = ((1 - Fp) \times T_{645}) + (Fp \times T_{859})$$

T = Turbidez em NTU.

Os dados de R_{RS555} serão processados da mesma forma que os dados de R_{RS645} e R_{RS859} para águas menos turvas. Esse produto não será convertido em outro produto geofísico por meio de modelos matemáticos.

A avaliação dos ciclos de variações espaço-temporais de biomassa fitoplanctônica superficial será realizada com o emprego da técnica Empirical Orthogonal Function (EOF) sobre os dados de concentração superficial de clorofila-*a*. Após isso, esses ciclos poderão ser associados entre os ciclos de variações de forçantes físicas, tais como a vazão do Rio Doce, turbidez superficial e/ou a circulação oceânica de pequena e meso-escala.

Imagens de cor verdadeira também serão utilizadas na identificação visual (qualitativa) da pluma de sedimentos oriunda do rio. Por meio dessas imagens serão avaliadas as áreas de ação superficial da pluma, bem como seus deslocamentos. Por fim, os dados obtidos via sensoriamento farão parte do banco de dados utilizados na calibração do modelo proposto no referido tópico.

b) Material particulado em suspensão

- Pré-campo

Previamente à pesagem, os filtros (fibra de vidro; diâmetro 47 mm; porosidade 0,45 μ m) limpos devem ser colocados em placas de Petri (limpas) para secar em estufa à 40°C por no mínimo 24 horas. Após secagem, os filtros devem esfriar em um dessecador por 2 horas e proceder para pesagem em uma balança analítica (0,1 mg). Cada filtro deve ser identificado com um número e ter seu peso anotado em uma planilha. Após pesagem, cada filtro deve ser individualmente embalado (papel alumínio ou saco plástico) com sua respectiva identificação.

- Pós-campo

As amostras devem ser organizadas (Superfície, Meio e Fundo) para evitar qualquer confusão. As amostras deverão ser filtradas em duplicata para envio para análise de mineralogia do MPS.

Em uma planilha, anotar a amostra a ser filtrada e o número do respectivo filtro a ser utilizado. Posicionar o filtro a ser utilizado no aparato de filtração, com o auxílio de uma pinça sem ponta, entre o suporte do aparato e o copo de filtração. Agitar a amostra vigorosamente, preencher cada copo com uma amostra a ser analisada e iniciar a filtração. Lembrar sempre de anotar o nome da amostra ao respectivo número do filtro utilizado e do volume filtrado de cada amostra. Terminada a filtração, os filtros devem ser novamente colocados em placas de petri (limpas) identificadas de acordo com a amostra referente ao filtro utilizado e serem levadas para a estufa à 40°C para secar por 48 horas. Terminadas as 48 horas, remover os filtros da estufa e deixar esfriar em um dessecador por 1 hora para então proceder para pesagem.

- Análise do teor de matéria orgânica total (MOT) do MPS

Após pesagem dos filtros, os mesmos devem seguir para queima de matéria orgânica total em mufla. Os filtros devem ser colocados em cadinhos de porcelana devidamente identificados à lápis e levados à Mufla. A queima deve ser realizada por um período de 4h à 450°C. Terminadas as 4h, colocar o cadinho de porcelana contendo o filtro para esfriar em um dessecador por, no mínimo, 1h. Após, pesar o filtro em uma balança de precisão.

A massa de matéria orgânica total será o peso do filtro antes de ser levado à Mufla subtraído do peso do filtro após queima (MOT = filtro pré-queima – filtro pós-queima). O teor será a conversão deste valor em porcentagem.

c) Nutrientes

As análises de nutrientes deverão ser realizadas por 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. As amostras de água coletadas em garrafas de 1L serão filtradas em membrana de fibra de vidro para separação da fração dissolvida de nutrientes. Amostras sem filtragem serão separadas para a análise de nutrientes totais.

- Nitrato e nitrito

Para essa análise será realizada pelo método EPA 353.2, no qual a amostra de água filtrada 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) etilenodiamina dicloridrato, que se associam e formam o azo corante vermelho. O fluxo deverá passar por uma célula de 10mm e a absorbância medida a 520nm.

Procedimentos e materiais para análise de nitrato:

Material: Vidraria volumétrica propriamente limpas com o uso de Extran, depois lavadas com ácido clorídrico 10% e água ultrapura.

- Reagentes:

Cádmio granular (40-60 mesh) – Amálgama Cd-Cu: O cádmio precisa ser lavado com o uso de ácido clorídrico 6N. O amálgama Cd-Cu precisará ser feito com a adição de cerca de 100mL de sulfato de cobre a 2% em 10g de cádmio até a formação de um precipitado coloidal marrom ser formado. Lavar o amálgama com água ultrapura até a completa remoção do precipitado.

- Reagente estoque:

Reagente colorífico: Em aproximadamente 800mL de água ultrapura, adicionar 100mL de ácido fosfórico concentrado, 40g de sulfanilamida e 2 g de N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato. Após total dissolução, diluir para 1L. Estocar em garrafas âmbar e armazenar no escuro. Estável por meses.

Solução de Cloreto de amônio – EDTA: Dissolver 85g de cloreto de amônio e 0,1g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em 900mL de água ultrapura. Ajustar o pH para 9,1 para

amostras preservadas ou 8,5 para amostras não preservadas com hidróxido de amônio concentrado e diluir para 1L. Adicionar cerca de 0,5mL de Brij 35.

Solução estoque de nitrito e nitrato de 1000ppm.

- Calibração e padronização:

Deverá ser preparado uma série de padrões com a diluição da solução estoque de nitrato, ao menos 7, cobrindo a faixa de concentração desejada, juntamente com um branco (água ultrapura e reagentes). Ao menos um padrão de nitrito em igual concentração de um padrão de nitrato precisará ser feito para verificação da eficiência da coluna redutora de cádmio.

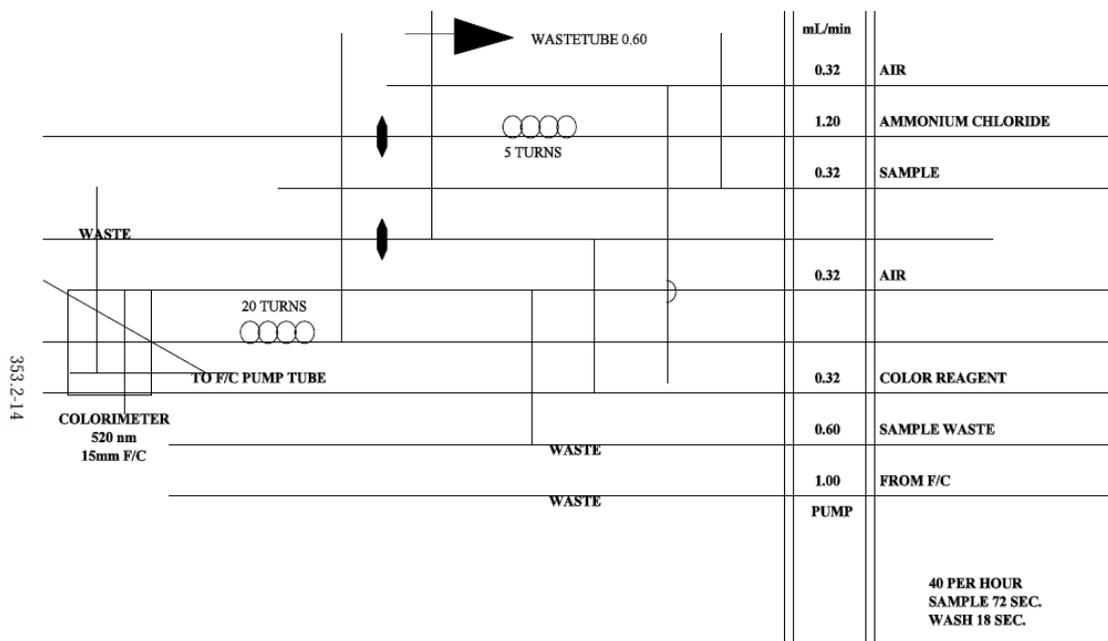
O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará ser configurado conforme a Figura 13. Cuidado para não introduzir ar dentro da coluna de redução.

Preparar a curva de calibração pela plotagem da resposta instrumental contra os valores de concentração. A curva concentração/resposta será baseada na curva de regressão com $R^2 \geq 0,99$.

Após a calibração ser estabelecida, precisa ser verificada pela análise do material certificado de referência (CRM) como controle de qualidade da amostra, não podendo exceder 10% do valor do CRM.

O condicionamento da coluna deverá ser realizado com a corrida de um padrão de 1 ppm por 10 minutos se uma coluna nova for preparada. Subsequentemente, lavar a coluna com água ultrapura por 20 minutos.

Figura 13. Manifold Nitrito-Nitrato



- Procedimento:

Caso o pH da amostra esteja abaixo de 5 ou acima de 9, ajuste precisa ser realizado para entre esses valores com a adição de HCl concentrado ou hidróxido de amônio concentrado.

O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará ser configurado conforme a Figura 13. Cuidado para não introduzir ar dentro da coluna de redução.

Permita que o sistema se equilibre como requerido. Obtenha uma linha base estável com todos os reagentes, alimentando água ultrapura através da linha da amostra.

Coloque os padrões de nitrato e/ou nitrito na amostradora em ordem decrescente de concentração e complete preenchendo a amostradora com as amostras.

Troque a linha de amostras para a amostradora e comece a análise.

- Nitrito

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

- Ortofosfato

Deverá ser utilizado o método EPA 365.5. Molibdato de amônio e Tartarato de antimônio e potássio reagem em meio ácido com a soluções de fosfato para formação de um complexo antimônio-fosfo-

molibdato. Esse complexo é reduzido para um complexo de coloração azul intenso pelo ácido ascórbico. A coloração produzida é proporcional a concentração de fosfato presente na amostra.

- Procedimentos e materiais para análise de ortofosfato:

Material: Vidraria volumétrica propriamente limpa com o uso de Extran, depois lavadas com ácido clorídrico 10% e água ultrapura.

- Reagentes:

- Reagentes estoque:

Solução de molibdato de amônio (40 g/L): Dissolva 20,0g de molibdato de amônio tetrahidratado ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) em aproximadamente 400mL de água ultrapura e afira para 500mL. Armazenar em garrafa plástica e no escuro. Estável por até três (3) meses.

Solução de tartarato de antimônio e potássio (3,0 g/L): Dissolver 0,3g de tartarato de antimônio e potássio (K(SbO)C₄H₄O₆·1/2H₂O) em aproximadamente 90mL de água ultrapura e aferir para 100mL. Estável por até três (3) meses.

Solução de ácido ascórbico (18,0 g/L): Dissolver 18,0g de ácido ascórbico (C₆H₆O₆) em aproximadamente 800mL de água ultrapura e aferir para 1L. Armazene cerca de 75mL em um frasco limpo de polietileno no freezer. Estabilidade da solução é de três (3) meses para o ácido congelado e de dez (10) dias para refrigerado.

Solução de lauril sulfato de sódio (SLS)/ dodecil sulfato de sódio (30,0 g/L; CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na): Dissolver 3,0g de SLS em aproximadamente 80mL de água ultrapura e aferir para 100mL. Esta solução é um agente umectante e estável por aproximadamente três (3) semanas.

Solução ácido sulfúrico (4,9N): Vagarosamente adicione 136mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) em aproximadamente 800mL de água ultrapura. Após esfriar, dilua para 1L com água ultrapura.

Solução estoque de ortofosfato de 1000ppm.

- Reagentes de trabalho:

Reagente A: Misturar os seguintes reagentes: 100mL de ácido sulfúrico 4,9N, 30mL de molibdato de amônio, 10mL de tartarato de antimônio e potássio e 2,0mL de SLS. Preparar diariamente.

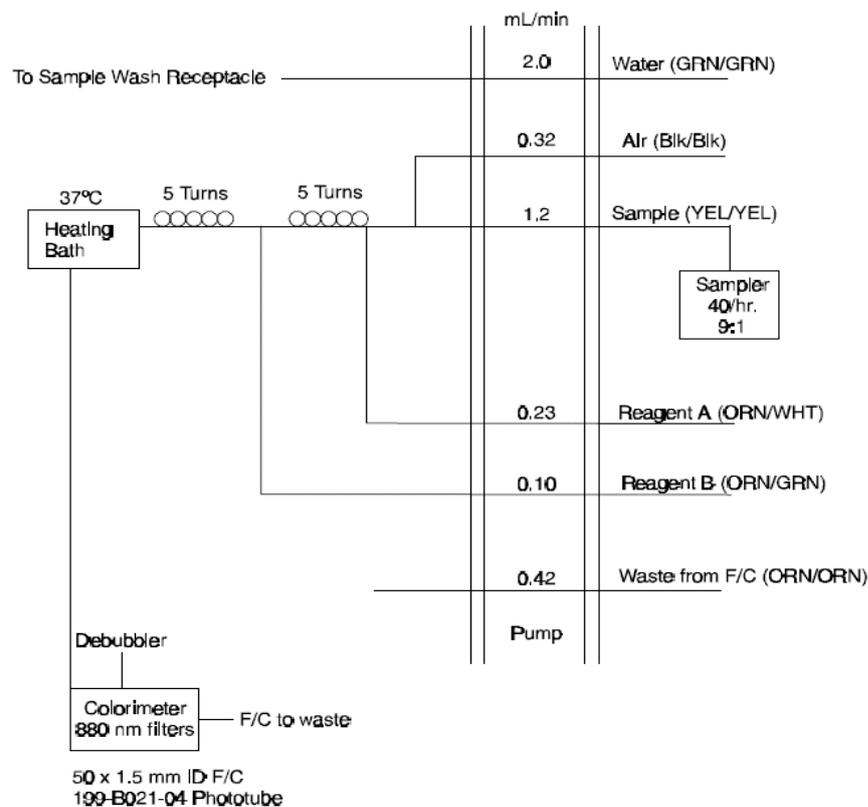
Reagente B: Adicionar aproximadamente 0,5mL de SLS nos 75mL de ácido ascórbico. Estabilidade de aproximadamente 10 dias se refrigerado.

Reagente refratário: Adicionar 50mL de ácido sulfúrico 4,9N em 20mL de água ultrapura e depois 1,0mL de SLS. Preparar a cada dois dias.

- Procedimento:

- O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará ser configurado conforme a Figura 14.
- Permitir que o equipamento estabilize a temperatura por cerca de 30 minutos.
- Obtenha uma linha base estável com todos os reagentes, alimentando água ultrapura através da linha da amostra.
- Preparar a curva de calibração (mínimo 7 níveis de concentração) pela plotagem da resposta instrumental contra os valores de concentração. A curva concentração/resposta será baseada na curva de regressão com $R^2 \geq 0,99$.
- Após a calibração ser estabelecida, precisa ser verificada pela análise do material certificado de referência (CRM) como controle de qualidade da amostra, não podendo exceder 10% do valor do CRM.
- Coloque os padrões de ortofosfato na amostradora em ordem decrescente de concentração e complete preenchendo a amostradora com as amostras.
- Troque a linha de amostras para a amostradora e comece a análise.

Figura 14: Configuração do Manifold para ortofosfato.



- Silicato

- A análise deverá ser realizada pelo método EPA 366.0 que consiste na formação de ácido β -molibdosilícico pela reação do silicato da mostra com a solução ácida de molibdato. O ácido β -molibdosilícico é então reduzido pelo ácido ascórbico para formar o azul de molibdênio. A absorvância dessa cor é proporcionalmente linear a concentração de silicato e medida a 660nm.

Procedimentos e materiais para análise de silicato:

Material: Vidraria volumétrica em polipropileno propriamente limpas com o uso de Extran, depois lavadas com ácido clorídrico 10% e água ultrapura.

- Reagentes:

- Reagentes estoque:

Solução de ácido Sulfúrico (0,05M): Cuidadosamente adicionar 2,8mL de ácido sulfúrico concentrado em aproximadamente 800mL de água ultrapura e aferir para 1L.

Solução de molibdato de amônio (10 g/L): Dissolver 10g de molibdato de amônio (VI) tetra hidratado em aproximadamente 800mL de ácido sulfúrico 0,05M e aferir para 1L com ácido sulfúrico 0,05M. Armazenar em frasco âmbar por um (1) mês. Caso forme precipitados brancos na parede do frasco, descartar e preparar uma nova solução.

Solução estoque de silicato de 1000ppm.

- Reagentes de trabalho:

Solução de ácido ascórbico: Dissolver 4,4g de ácido ascórbico em 200mL de água ultrapura e 12,5mL de acetona (C_3H_6O), aferir para 250mL com água ultrapura. Estocar em frasco plástico. Solução estável por uma semana se mantida refrigerada.

Solução de ácido oxálico: Dissolver 50g de ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) em aproximadamente 800mL de água ultrapura e aferir para 1L. Estocar em frasco plástico. Solução estável por aproximadamente 3 meses.

- Calibração e padronização

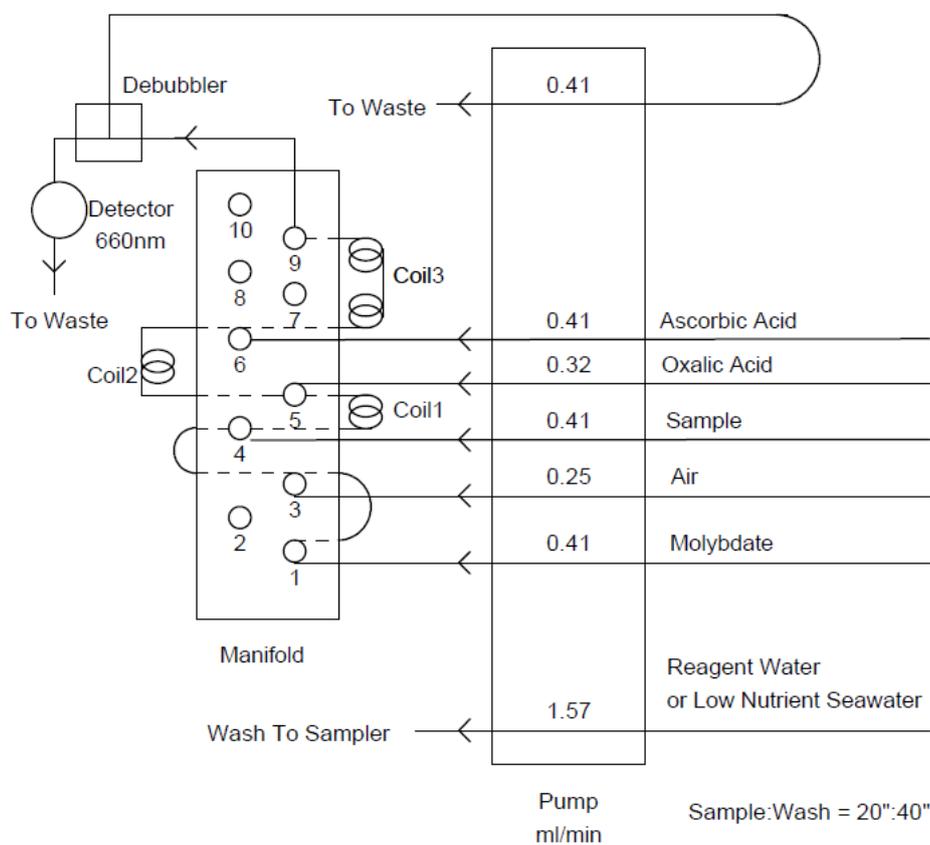
Deverá ser preparado uma série de padrões com a diluição da solução estoque de silicato, ao menos 7, cobrindo a faixa de concentração desejada, juntamente com um branco (água ultrapura e reagentes).

O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará ser configurado conforme a Figura 15.

Preparar a curva de calibração pela plotagem da resposta instrumental contra os valores de concentração. A curva concentração/resposta será baseada na curva de regressão com $R^2 \geq 0,99$.

Após a calibração ser estabelecida, precisa ser verificada pela análise do material certificado de referência (CRM) como controle de qualidade da amostra, não podendo exceder 10% do valor do CRM.

Figura 15: Configuração do Manifold para análise de silicato



- Procedimento

Caso as amostras estejam congeladas, condiciona-las no escuro a 4°C antes das análises.

O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará estar configurado conforme a Figura 3.

Permita que o sistema se equilibre como requerido por pelo menos 30 minutos. Obtenha uma linha base estável com todos os reagentes, alimentando água ultrapura através da linha da amostra.

Coloque os padrões de silicato na amostradora em ordem decrescente de concentração e complete preenchendo a amostradora com as amostras.

Troque a linha de amostras para a amostradora e comece a análise.

- Nitrogênio amoniacal

O método utilizado será o EPA 350.1 que consiste no tamponamento da amostra a pH em 9,5 com solução de borato para diminuir a hidrólise dos cianetos e compostos nitrogenados. Fenol e hipoclorito reagem com a amônia para formar o azul de indofenol que é proporcional a concentração de amônia. A cor azul formada é intensificada com nitroprussiato de sódio e medida colorimetricamente.

- Procedimentos e materiais para análise de nitrogênio amoniacal.

Material: Vidraria volumétrica propriamente limpas com o uso de Extran, depois lavadas com ácido clorídrico 10% e água ultrapura.

- Reagentes

- Solução de ácido bórico (20g/L): Dissolver 20g de H₃BO₃ em água ultrapura e aferir para 1L.
- Tampão de borato: Adicionar 88mL de 0,1N NaOH em 500mL da solução de tetraborato de sódio 0,025M (5,0g de Na₂B₄O₇ anidro ou 9,5g de Na₂B₄O₇·10H₂O por litro) e diluir para 1L com água ultrapura.
- Hidróxido de sódio (1N): Dissolver 40g de NaOH em água ultrapura e aferir para 1L.
- Reagentes de cloração: Alguns reagentes podem ser usados para remoção do cloro residual, incluem:
 - - Tiosulfato de sódio: Dissolver 3,5g Na₂S₂O₃·5H₂O em água ultrapura e aferir para 1L. Um mililitro (mL) dessa solução removerá 1mg /L de cloro residual em 500mL de amostra.
 - - Sulfito de sódio: Dissolver 0,9g Na₂SO₃ em água ultrapura e aferir para 1L. Um mililitro (mL) dessa solução removerá 1mg /L de cloro residual em 500mL de amostra.
 - Ácido Sulfúrico 5N: Cuidadosamente adicionar 139mL de ácido sulfúrico concentrado em aproximadamente 500mL de água ultrapura. Esperar esfriar e diluir para 1L.
 - Fenolato de sódio: Dissolver 83g de fenol em 500mL de água ultrapura. Em pequenas adições, cuidadosamente adicionar 32g de NaOH. Quando esfriar, diluir para 1L com água ultrapura.
 - Solução de hipoclorito de sódio: Diluir 250mL da solução contendo 5,25% de NaOCl em 500mL de água ultrapura. O nível de cloro disponível precisa estar em aproximadamente 2-3%.
 - EDTA (5): Dissolver 50g de EDTA e seis (6) pastilhas de NaOH em 1L de água ultrapura.
 - Nitroprussiato de sódio (0,05%): Dissolver 0,5g de nitroprussiato de sódio em 1L de água ultrapura.
 - Solução estoque de nitrogênio amoniacal de 1000ppm

- Calibração e padronização

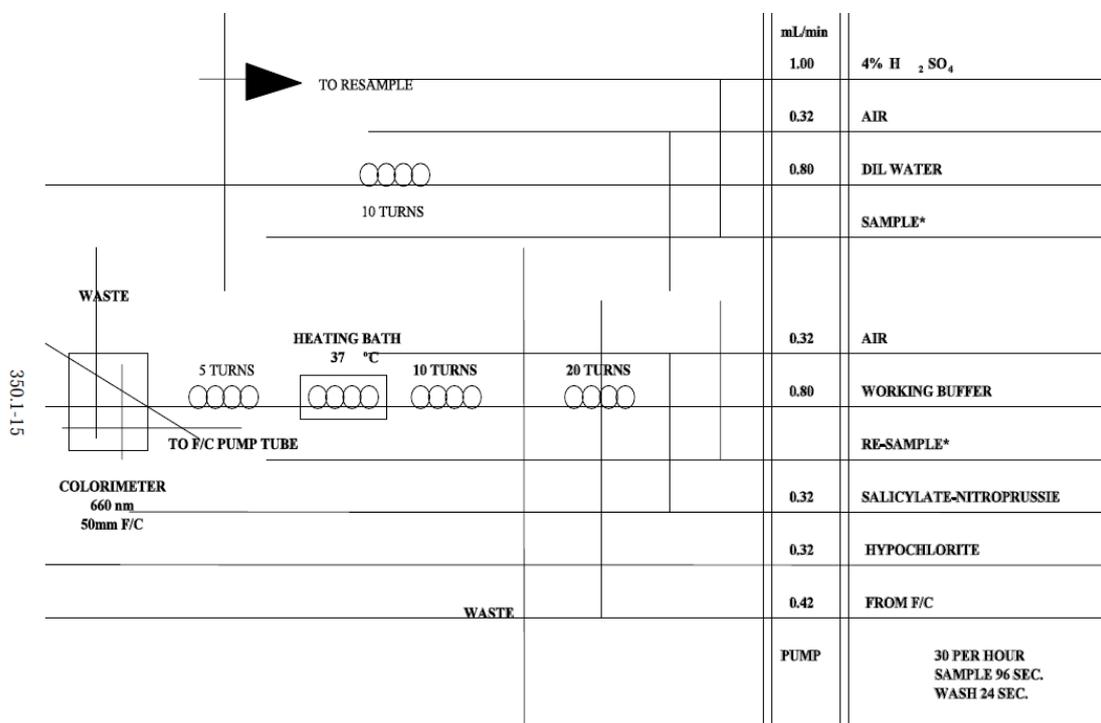
Deverá ser preparado uma série de padrões com a diluição da solução estoque de nitrogênio amoniacal, ao menos 7, cobrindo a faixa de concentração desejada, juntamente com um branco (água ultrapura e reagentes).

O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará ser configurado conforme a Figura 16.

Preparar a curva de calibração pela plotagem da resposta instrumental contra os valores de concentração. A curva concentração/resposta será baseada na curva de regressão com $R^2 \geq 0,99$.

Após a calibração ser estabelecida, precisa ser verificada pela análise do material certificado de referência (CRM) como controle de qualidade da amostra, não podendo exceder 10% do valor do CRM.

Figura 16: Configuração do Manifold para análise de nitrogênio amoniacal.



- Procedimento

Preparação da amostra: Remover cloro residual na amostra com adição do agente para decoloração equivalente para o cloro residual. Para 400mL de amostra, adicionar 1N NaOH até pH 9,5.

O manifold do AutoAnalyzer AA3 precisará estar configurado conforme a Figura 4.

Permita que o sistema se equilibre como requerido por pelo menos 30 minutos. Obtenha uma linha base estável com todos os reagentes, alimentando água ultrapura através da linha da amostra.

Coloque os padrões de nitrato e/ou nitrito na amostradora em ordem decrescente de concentração e complete preenchendo a amostradora com as amostras.

Troque a linha de amostras para a amostradora e comece a análise.

- 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.

- Reagentes

Reagente de oxidação (RO): Dissolva cerca de 50g de persulfato de potássio e 30g de ácido bórico em 350mL de hidróxido de sódio 1M e aferido para 1L com água ultrapura. A solução deve ser armazenada em frascos âmbar a temperatura ambiente e protegido da luz. Procedimentos, materiais e reagentes para análise de nitrito+nitrato e ortofosfato (EPA 353.2 e EPA 365.5) descritos acima.

- Procedimento

Cerca de 30mL de amostra serão condicionadas em tubos de polipropileno (tipo FALCON) e será adicionado 4mL da solução RO. Os tubos serão bem fechados e autoclavados por 30 minutos de acordo com procedimentos recomendados pelo fabricante. Após esse procedimento, os tubos serão agitados gentilmente e resfriados até temperatura ambiente até serem abertos. O volume ajustado para 40mL com água ultrapura, então 10mL dessa amostra será transferida para análise de nitrato, enquanto que os 30mL remanescentes serão usados para análise de ortofosfato. Brancos com apenas a solução RO e água ultrapura serão submetidos ao mesmo procedimento descrito para controle de qualidade do processo. Para avaliar o procedimento de digestão, material certificado de referencia para nitrogênio total e fósforo total também serão submetidos ao procedimento de digestão da mesma forma que as amostras.

Alternativamente, análise de nitrogênio total poderá ser realizada por uso de um analisador TOC pela combustão catalítica e detecção de quimioluminescência.

d) Compostos Orgânicos

- Extração de Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Aromáticos e Marcadores Lipídicos em Amostras de Água.

- Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas devem ser submetidas, previamente, a um procedimento de limpeza, visando evitar a contaminação das amostras, o que pode interferir nos resultados. Primeiramente, as vidrarias devem ser deixadas em banho de detergente Extran (5%) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada com água corrente, água destilada, água milli-Q, acetona e por fim calcinadas em mufla à 450°C por um período de 4 horas.

- Etapa de Extração

Transferir a amostra para um funil de separação e adicionar 100 μL de solução padrão (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) das parafinas deuteradas (n-C20d, n-C24d e n-C30d) e 20 μL de solução padrão 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ p-terfenil) de forma que a concentração após diminuição do volume até 1mL no final do processo seja de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as parafinas e de 100 ng mL^{-1} para o p-terfenil-d14. Para a recuperação de esteróis utiliza-se o androstanol (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida adicionar 50 mL de diclorometano, agitar o funil por três minutos e deixar decantando por 5 minutos, adicionando NaCl para evitar possível formação de emulsão. Após a decantação a fase orgânica (fase inferior) deve ser retirada e a fase aquosa coletada na garrafa que continha a amostra ou mantida no funil de separação para subsequente repetição da extração. A fase orgânica deve ser passada através de um funil de vidro contendo lã de vidro e sulfato de sódio calcinado para remoção de umidade e recolhida em balão de fundo chato. Repetir o procedimento de extração mais duas vezes. Reduzir o volume do extrato obtido ao final do processo até aproximadamente 2 mL no rotaevaporador, secar no fluxo de nitrogênio, ressuspender para hexano e guardar o extrato para posterior fracionamento.

- Etapa de Fracionamento (Cleanup)

O fracionamento é feito em coluna cromatográfica de vidro (30 cm x 1,3 cm), previamente descontaminada com hexano. Para reter a fase sólida transferir um chumaço de lã de vidro descontaminada no fundo da coluna com a ajuda de um bastão de vidro a fim de evitar a passagem dos adsorventes. Em seguida adicionar hexano em um béquer contendo 8 g de sílica (ativada a 160 $^{\circ}\text{C}$ / 16 h e desativada com 2% de água milli-Q), e transferir essa mistura para a coluna com a ajuda de uma pipeta pasteur. Repetir o mesmo procedimento adicionando-se 1g de alumina (calcinaada a 450 $^{\circ}\text{C}$ / 4 h e desativada com 2% de água milli-Q) e em seguida 600 mg de sulfato de sódio (calcinaada a 450 $^{\circ}\text{C}$ / 4 h), evitando sempre que os adsorventes fiquem sem solvente. Após a montagem da coluna, transferir o extrato com o auxílio de uma pipeta pasteur, lavando o balão repetidas vezes com o solvente apropriado para cada eluição. Deve-se atentar para a troca do solvente do extrato. Lembrando que este foi obtido com solvente mais polar (diclorometano) que o solvente para eluição inicial (hexano), realizar a ressuspensão para hexano após processo de secagem com nitrogênio. Fazer a primeira eluição com 50 mL de hexano para remoção da fração contendo os alifáticos e a segunda eluição com 70 mL de uma mistura de hexano:diclorometano (1:1) para a fração dos aromáticos. As frações 3 e 4 são separadas por eluição com 50 mL de acetato de etila e 70 mL de metanol, respectivamente. Reduzir o volume das duas frações até aproximadamente 2 mL em rotaevaporador, transferir o extrato para um vial e reduzir o volume até 1 mL com N_2 , lavando três vezes o balão com hexano. Após redução do volume, adicionar padrão interno deuterado de alcanos (n-C16d) e HPA (5 HPA deuterados) nas respectivas frações. Para a quantificação de biomarcadores como terpanos, esteróis e ácidos presentes nas frações F3 e F4, será utilizado o alfa-colestano como padrão interno e androstanol como surrogates (5 $\mu\text{g/mL}$). A determinação dos alcanos deve ser feita no CG-FID e dos HPA e demais marcadores no GC-MS.

- Quantificação

A quantificação e identificação dos compostos será realizada através de um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c, ambos equipados com auto amostradores CTC Combi Pal, injetor Split/splitless e coluna capilar DB-5MS (30 m x 0.250 mm x 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP será 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-C16d – 10 µg / mL). A determinação quantitativa de HTP será 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 é 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 são 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 é realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas são 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 no Quadro 44. Os HPA serão determinados através do monitoramento full scan (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 são utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. As curvas analíticas para esteróis e ácidos variam de 0,5 ug/mL a 20 ug/mL. Os padrões de ácidos graxos utilizados são preparados partir de uma mistura contendo 37 ácidos graxos saturados e insaturados. Para a quantificação de esteróis e terpenóides são utilizados os padrões de dihidrocolesterol, colesterol, estigmastanol, 5a-colestan-3-ona, 5-alfa-colestano, coprostanol, 3beta-taraxerol, campesterol, lanosterol, 3beta-hidróxi-5alfa-androstano, b-sitosterol, e estigmasterol.

Os demais compostos identificados serão determinados em função do padrão interno adicionado, devido a inexistência de padrões comerciais referentes as classes a serem avaliadas. A identificação dos compostos é feita pela comparação com injeção de soluções contendo padrões autênticos e consulta à biblioteca de espectros de massas NIST do equipamento.

Quadro 44. 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

Padrão	Íons de quantificação (m/z)	Padrão Interno	Íons de quantificação (m/z)
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 à resposta analítica do sistema cromatográfico serão feitas com injeções dos padrões durante as análises das amostras de sedimento. Nestes ensaios será utilizado 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 são realizados como controle de garantia das análises.

Valores de recuperação obtidos na faixa entre 70 e 120 % são considerados aceitos como índices de bom desempenho analítico para o método. Cada batelada de extração deve 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, serão realizadas análises de amostras de sedimento certificado de referência (Standard Reference Material NIST 1941b).

- Extração de Éter-aminas e aminas aromáticas

- Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas devem ser submetidas, previamente, a um procedimento de limpeza, visando evitar a contaminação das amostras, o que pode interferir nos resultados. Primeiramente, as vidrarias devem ser deixadas em banho de detergente Extran (5%) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada com água corrente, água destilada, água milli-Q, acetona e por fim calcinadas em mufla à 450°C por um período de 4 horas.

- Etapa de Extração

A fração dissolvida de amostras de água (1000 ml) são passadas 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. Após, são 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. Alternativamente ao método de SPE, pode-se realizar a extração líquido-líquido utilizando-se diclorometano (50 mL x 3) e o extrato total pré-concentrado com fluxo de nitrogênio e armazenado para posterior análise.

- Quantificação

A determinação quantitativa das aminas será realizada por cromatografia em fase gasosa equipado com um espectrômetro de massas e amostrador automático. Injeção realizada no modo splitless, (ativação em 40 s em 280°C). Hélio utilizado como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno 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. Colunas analíticas utilizadas: DB-5 de 30m, ID 0,25 mm e espessura de filme 0,25 mm (J & W Scientific). GC-MSD no modo eV EI operando no modo full scan (40-550 uma), temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente. Para a quantificação de aminas serão utilizados padrões de alta pureza dos seguintes compostos: n-ethyl-n-(4-methylphenyl)amine, trifetilamina, n-(4-clorofenil)-1,2-fenilenodiamina, isoamilamina, m-dpeg@8-amine, dodecilamina, dimethyl-d6-amine hydrochloride.

- Determinação de fenóis em água

O método analítico para os fenóis, descrito abaixo, é baseado e adaptado das metodologias EPA 3630 Silica Gel Cleanup; EPA 3510c Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction; EPA 8270C Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), EPA8041a Phenols By Gas Chromatography e EPA5021a Volatile Organic Compounds In Various Sample Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis, Method 528 Determination Of Phenols In Drinking Water By Solid Phase Extraction And Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).

- Resumo

O volume total de amostra (1 litro) é extraído com diclorometano usando um funil de separação. Após a concentração dos extratos é necessário o processo de fracionamento e pré-concentração dos analitos (clean up) em coluna cromatográfica por adsorção em fase sólida-líquida para posterior análise em GC/MS.

- Procedimentos

- Extração Líquido-Líquido (EPA 3510C)

- A retirada da fração rica em fenóis proveniente das amostras de água é feita através de extração líquido-líquido:

- Transferir a amostra (1 litro) para o funil de separação, adicionando os padrões de recuperação (surrogates) e 50 mL de diclorometano;
- Agitar o funil de separação vigorosamente (agitação manual ou mecânica) por durante 3 minutos, atentando para a abertura periódica do funil para liberar o excesso de pressão;
- Deixar repousar por aproximadamente 5 minutos para separação da fase aquosa da orgânica do solvente.
- Recolher o extrato em balão, com o auxílio de um funil preenchido com Na₂SO₄, para remoção de água;
- Repetir o processo mais duas vezes;
- Concentrar o extrato recolhido em evaporador rotativo e avolumar para aproximadamente 1 mL com auxílio de fluxo de nitrogênio.

- Derivatização:

Adicionar 40 uL do agente BSTFA:TMCS (99:1) aquecendo a solução à 65 °C em estufa por 1 hora, para formar os derivados trimetilsilanos (TMS) dos analitos fenólicos;

Secar novamente a solução em fluxo de nitrogênio;

Adicionar 1 mL de hexano.

- Purificação e Fracionamento (EPA 3630):

A purificação/fracionamento do extrato de fenóis derivatizados é obtida por cromatografia líquida de adsorção em coluna de sílica:

Com o auxílio de um funil para sólidos, preencher a coluna cromatográfica (10 mm) com 4g de sílica (pré-limpa e desativada a 5%) pesada em aproximadamente 20 mL de hexano. O empacotamento deve ser homogêneo eliminando a formação de “canais” preferenciais de drenagem do solvente;

Depositar aproximadamente 1 cm de Na₂SO₄ (pré-limpo e seco) no topo da coluna a fim de assegurar a remoção de água do extrato. Não deixar, entretanto, que o adsorvente seja exposto ao ar;

O extrato (1 mL) é então transferido cuidadosamente para a coluna com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Para garantir a transferência total do extrato, lavar o tubo de ensaio com hexano (0,5mL) e transferir para a coluna. Repetir a lavagem pelo menos 3 vezes, tomando o cuidado de não usar mais do que 2 mL de hexano na lavagem;

- Serão obtidas quatro frações:
- F1: 10 mL de 15% de tolueno em hexano;

- F2: 10 mL de 40% de tolueno em hexano;
- F3: 10 mL de 75% em tolueno;
- F4: 10 mL de 15% de 2-propanol em tolueno

O fluxo da eluição para as frações deve ser de aproximadamente 1 gota por segundo na torneira da coluna cromatográfica.

Juntar todas as frações em um único volume;

Concentrar o extrato até 1 mL em evaporador rotativo e fluxo de nitrogênio. Proceder com a análise Cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS) ou cromatógrafo gasoso com detector de ionização por chama (GC/FID).

- Método alternativo - extração por headspace (EPA 5021a)

Alíquotas de 10 mL da amostra são adicionadas em frascos de headspace de 22 mL. Em seguida adiciona-se 4 g de cloreto de sódio, 0,4 g de carbonato de potássio e 100 µL de anidrido acético. Após adição destes reagentes o vial deve ser hermeticamente selado com tampas de alumínio e septo de PTFE faceado com silicone. As amostras são então levadas para o Auto amostrador Headspace que procede com o processo de extração por agitação e aquecimento.

- Método alternativo - determinação de fenóis por SPE

Analitos e surrogates são extraídos pela passagem de uma amostra de 1L de água através de um cartucho de extração em fase sólida (SPE) contendo 0,5 g de um copolímero de benzeno divinil poliestireno modificado. Os compostos orgânicos são eluídos da fase sólida com uma pequena quantidade de cloreto de metileno. Os componentes da amostra são separados, identificados e quantificados pela injeção de uma alíquota do extrato concentrado em uma coluna capilar de sílica fundida de alta resolução em um sistema de GC/MS. Compostos de eluídos da coluna GC são identificados por comparação dos seus espectros de massa e tempos de retenção por espectros de referência e tempos de retenção em uma base de dados.

- Análise instrumental

- Cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS EPA 8270)

As condições instrumentais de operação são as seguintes:

- Coluna cromatográfica capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno com fase de 5% fenil / 95%metil siloxano e 0,25 µm de espessura do filme;
- Gás carreador: hélio
- Temperatura da fonte: 200°C
- Impacto eletrônico: 70eV

- Temperatura da Interface: 280°C
- Temperatura do injetor: 280°C
- Modo de injeção: split, razão do split 1/10
- Volume de injeção: 1µL

Programação temperatura: temperatura inicial de 50°C por 2 minuto, 35°C min⁻¹ até 100o, 10°C min⁻¹ até 310°C e isotérmico por 10 minutos.

- Análise instrumental GC-FID/PID-HS e GC-MS/HS (EPA5021a)

As análises serão realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado com detectores de fotoionização (PID) e ionização em chama (FID) acoplados em série, equipado com injetor split/splitless, e lâmpada de criptônio de 10,6 eV. Os parâmetros experimentais utilizados serão os seguintes: coluna DB-5MS 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme, programa de temperatura (70 °C durante 5 minutos, aquecimento até 120°C / 8°C min⁻¹, até 135°C / 2°C min⁻¹ e finalmente até 280°C / 8°C min⁻¹). Hélio utilizado como gás de arraste com a vazão de 2,0 mL min⁻¹. O injetor foi mantido a 270°C com purga de septo constante e programado para retornar a modo split após 3 minutos do início da corrida sob a vazão de 50 mL min⁻¹. Os detectores PID e FID são programados a 250 e 280°C respectivamente. Também poderá ser utilizado alternativamente um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c operando em condições semelhantes às do GC-PID/FID: coluna de mesmas dimensões e fase estacionária, mesma programação de temperatura e condições do injetor, com apenas uma redução na vazão do gás de arraste hélio (1 mL min⁻¹). Linha de transferência mantida a 280°C. O espectrômetro é configurado para aquisição de íons positivos por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV. e scan na faixa de razão massa/carga de 40 a 350 m/z. O detector mantém o filamento desligado (delay time) nos primeiros 5 min de aquisição. Ambos equipamentos dispõem de auto amostrador Headspace (HS) que viabiliza a extração dos compostos fenólicos derivatizados por volatilização e posterior injeção da fração gasosa no injetor dos cromatógrafos. No amostrador as amostras serão submetidas a agitação por 30 minutos sob a temperatura constante de 45°C. Após este período uma seringa retira uma alíquota de 1 mL da fração gasosa (Headspace) e leva para a porta do injetor.

- Quantificação

A quantificação dos compostos fenólicos é mediante curvas de calibração construídas com padrões analíticos na faixa de concentração que foram divididas dentro da faixa de 0,125 a 1000 µg L⁻¹ de uma solução mix de fenóis (aquilados, nitro e clorofenóis). Para amostras mais concentradas, curvas analíticas são construídas em níveis superiores de concentração, na ordem de mg L⁻¹, ou utiliza-se o método de diluição como alternativa para quantificação. Parâmetros de mérito são determinados tais como, faixa linear, coeficientes de correlação, precisão e limites de detecção e quantificação de maneira a avaliar o desempenho do método proposto para a determinação de compostos fenólicos em água. Coeficientes de correlação (R²) superiores a 0,99 para cada analito são utilizados como

critério de qualidade. Frascos contendo apenas água ultrapura e reagentes derivatizantes são submetidos a extração e análise como controle e critério de qualidade e rastreabilidade dos processos analíticos. Também são avaliados diariamente a precisão da curva analítica através de cross check, injeção de padrões em diferentes concentrações como carta controle.

- Compostos organoclorados (OCs)

- Cuidados laboratoriais

Toda a vidraria utilizada é lavada e deixada de molho em uma solução de detergente Extran® alcalino por 12 horas, sendo posteriormente lavada com água corrente, água destilada e colocada para secar a 100°C em estufa para em seguida ser aquecida em forno mufla a 400°C durante 4h. Todo o material que não possa ser levado ao forno mufla, é lavado com solventes com alto grau de pureza (etanol, n-hexano e diclorometano - DCM) antes do seu uso.

Os adsorventes utilizados em todo o procedimento laboratorial (alumina e sulfato de sódio) são calcinados e armazenados em dessecadores, para que não estejam úmidos no momento do uso, na etapa de cromatografia de adsorção em coluna.

- Método analítico

A determinação dos compostos organoclorados (OCs) será realizada no Laboratório de Geoquímica Orgânica e Poluição Marinha (LaGPoM) do Centro de Estudos do Mar-UFPR. A metodologia para a extração dos compostos das amostras de água será baseada no protocolo EPA 3510C - Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction (USEPA, 1996).

As amostras de água serão extraídas em funil de separação, e consiste em adicionar 60 mL de DCM por 1 L da amostra, misturar por 2 min, sempre abrindo o frasco para aliviar a pressão interna, e transferir para o funil de decantação. Deve-se misturar as fases por 1 min e deixar repousar (decantar) por 10 min. A fase aquosa é descartada e a fase orgânica será utilizada para as próximas etapas da análise. Esse processo deve ser repedido 3 vezes. Nas amostras de água também será adicionada a mistura de padrão subrogados.

As amostras são concentradas no rotavapor rotativo até 2 mL, e em seguida, é realizada a etapa de purificação por cromatografia de adsorção em coluna. Essas colunas são preparadas com sulfato de sódio e 3,2 g de alumina 5% desativada com água destilada (extraída 5 vezes com n-hexano, para assegurar a ausência de possíveis interferentes orgânicos), e a eluição com 20 mL de uma mistura de DCM e n-hexano (3:7, v:v). Por fim, os extratos são concentrados até 250 µL e nesse momento, é adicionado 25 µL de uma solução de tetracloro-m-xileno (TCMX, 1 ng µL⁻¹), utilizado como o padrão interno. Em seguida, as amostras são armazenadas em ampolas de vidro para posterior determinação dos OCs através de cromatografia gasosa.

Para a determinação dos OCs, os extratos de 2 µL das amostras são injetados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectômetro de massa (GC-MS), no modo SIM (System Ion Monitoring),

equipado com coluna capilar, com 30 m de comprimento, 0,25 μm de espessura do filme, 250 μm de diâmetro interno e fase estacionária de 5% fenil- metil-siloxana. São registrados apenas os picos relacionados aos dois principais fragmentos (m/z) característicos de cada um dos compostos analisados. A rampa de aquecimento utilizada na separação dos POPs tem início em 75°C, permanecendo por 3 min, quando começa a subir a uma taxa de 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 150 $^{\circ}\text{C}$, depois sube até 260 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e então sobe até 300 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantendo-se estável nessa temperatura por 10 min, totalizando 75 min.

- Quantificação e controle analítico

Os compostos investigados são os PCBs (8, 18, 28, 31, 33, 44, 49, 52, 56/60, 66, 70, 74, 87, 95, 97, 99, 101, 105, 110, 114, 118, 123, 128, 132, 138, 141, 149, 151, 153, 156, 157,158, 167, 170, 174, 177, 180, 183,187, 189, 194, 195, 201, 203, 206 e 209) e os pesticidas organoclorados (o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'- DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DT, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, HCB, α -Clordano, γ -Clordano, Oxiclordano, Heptacloro, Heptacloro, Epoxido-a, Heptacloro Epoxido-b, Aldrin, Isodrin, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, Endosulfan I, Metoxicloro e Mirex).

Os picos obtidos no GC-MS são integrados por um sistema de aquisição de dados (HP Enhanced Chemstation G1701 CA). Para a quantificação são construídas curvas de calibração dos compostos, com concentrações da solução de padrões externos de pesticidas e PCBs de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$. Todos os compostos devem apresentar índice de correlação linear de Pearson igual ou superior a 99,5% ($r^2 \geq 0,995$), critério este utilizado para aceitação das mesmas. Todas as concentrações finais serão expressas em ng g^{-1} de sedimento seco, pela aplicação do fator de multiplicação obtido do quociente entre o volume final do extrato (250 μL) e a massa de sedimento extraída (20,0000 g).

A fim de identificar a presença de contaminantes durante o procedimento laboratorial, os brancos de extração são analisados a cada grupo de 11 amostras de sedimentos e água. Os valores encontrados devem ser três vezes menores que o limite de detecção do método (LDM), ou seja, não mostrar interferências externas significativas. Para estimar perdas ou ganhos de massa dos compostos analisados durante o procedimento analítico, o cálculo da recuperação dos padrões subrogados PCB 103 e PCB 198 é feita a partir da relação das suas quantidades obtidas com a quantidade adicionada de padrão interno TCMX. A recuperação deve estar dentro da faixa considerada aceitável para validação do método analítico (entre 40 e 120%).

O limite de detecção de um método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 95% de confiança, e essa concentração é diferente de zero e pode ser determinada em uma matriz contendo o analito. Nesse método, o LDM é calculado através da quantificação de uma pequena quantidade de analitos adicionados a uma matriz que não contem os compostos em estudo. O cálculo para determinação do limite de detecção é de três vezes o desvio padrão dessa matriz em cinco replicatas.

A eficiência do método pode ser verificada através da análise de amostras de intercomparação (IAEA-383) preparado pela Marine Environmental Laboratory of International Atomic Energy Agency (MEL/IAEA). De acordo com o critério de aceitação, a metodologia é considerada confiável se 80% dos compostos analisados estiverem dentro da faixa apresentada no certificado, acrescido de $\pm 35\%$.

e) Metais principais, traço e semimetais

- Preparação das amostras

Em laboratório cerca de 1 litro das amostras de água serão filtradas em membrana de porosidade 0,45 μm (previamente secas e pesadas), sendo o material retido na membrana e a água filtrada separados para análises dos metais para as frações particulada e dissolvida, respectivamente. Cerca de 500 mL da amostra sem filtração será separada para análise de metais totais e acidificadas com HNO_3 ultrapuro ($\text{pH} < 2$) juntamente com a água filtrada e armazenadas para posterior extração e análise. As membranas com o material particulado retido serão congeladas e liofilizadas para posterior pesagem e averiguação da quantidade do material particulado, sendo assim armazenadas a vácuo em dessecadores até a extração e análise.

- Metais totais na água

Para a extração dos metais totais nas amostras de água foi utilizado o método EPA 3015a. Resumidamente, uma alíquota de 45mL da amostra homogeneizada será transferida para os tubos de teflon, com posterior adição de 4mL de ácido nítrico concentrado destilado (*Sub-boiling*) + 2mL de ácido clorídrico concentrado ultrapuro. As amostras serão digeridas por meio do forno micro-ondas MARS 6 (CEM) com o uso de uma elevação de temperatura até 170°C em aproximadamente 10min., permanecendo nesta temperatura por outros 10min. Após o período de digestão e esfriamento dos tubos, em casos de particulados presentes, os extratos serão centrifugados ou filtrados em filtros quantitativos. Posteriormente, os extratos serão diluídos a aproximadamente 2% (v/v) da concentração de ácido nítrico para análise em ICP-MS descrito posteriormente.

- Metais no material particulado

Para a extração dos elementos no MPS retido nas membranas, será realizado de acordo com o método EPA 3051A. Os filtros serão adicionados nos tubos de digestão e extraídos com o uso de 10mL de ácido nítrico concentrado destilado, ou alternativamente, com o uso de 9mL de ácido nítrico concentrado destilado e 3mL de ácido clorídrico concentrado ultrapuro. Os tubos colocados no micro-ondas (CEM, MARS X-PRESS6), seguindo os seguintes parâmetros: 1ª rampa de temperatura 25°C a 175°C em 5:30min. e a 2ª rampa de 25°C a 175°C em 4:30min., ambas em potência de 1600 W. Em seguida, a solução será resfriada e filtrada em filtro quantitativo e posteriormente diluída para 100mL em balão volumétrico, procedendo-se então a análise por ICP-MS.

- Metais dissolvidos

A amostra filtrada em membrana de porosidade 0,45 μ m será acidificada (pH<2) com adição de HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e armazenada até análise. Em preparação para análise, a amostra acidificada será neutralizada com o uso de hidróxido de sódio (NaOH) com concentração de 1 molar (1M) e passada em colunas contendo resina catiônica (Chelex®, Sigma-Aldrich) para pré-concentração e a eliminação de sódio (Na) e outros possíveis interferentes inerentes à matriz ambiental, minimizando possíveis interferências durante a etapa de quantificação de metais.

- Especiação de metais

A técnica denominada DGT é relativamente recente, tendo sido desenvolvida por Davison e Zhang (1994) para medir quantitativamente espécies metálicas lábeis em sistemas aquáticos naturais, de maneira *in situ*. Nos dias atuais estes dispositivos estão sendo utilizados também em como sedimentos, água intersticial e solos (Davison e Zhang, 1994; Zhang e Davison, 1995, 1999, 2000, 2001).

Os dispositivos DGT permitem a separação das espécies lábeis no local de estudo, a partir do emprego de um hidrogel que age como uma camada difusiva, e da posterior acumulação dos analitos em uma fase ligante. A teoria na qual o DGT se baseia é decorrente das características difusionais das espécies metálicas e de semimetais em um hidrogel e nas propriedades sortivas de uma resina.

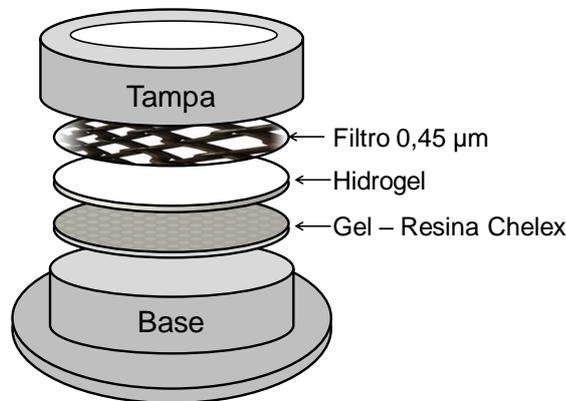
No sistema DGT uma camada contendo uma resina de troca iônica (Chelex-100), ou ainda outro material trocador, é separada da solução da amostra de água por um filme fino de uma matriz porosa (hidrogel) de espessura rigorosamente conhecida. O hidrogel controla o fluxo, ou seja, o transporte de massa das espécies no dispositivo. As espécies que se difundem livremente no hidrogel são aquelas que apresentam tamanhos moleculares suficientemente menores que o tamanho de poro do hidrogel. Nesta fase, o transporte das espécies ocorre por difusão molecular, pois o gel polimérico apresenta cerca de 90% de água e permite o movimento livre em escala molecular. As espécies livres e aquelas capazes de se dissociar de complexos metálicos na fase difusiva são acumuladas, por meio da complexação ou troca iônica, em uma resina ou material adsorvente.

Na aplicação deste dispositivo em uma amostra de água, há uma camada de difusão entre sua superfície e a solução. Nestas condições ocorre o transporte dos analitos só por difusão molecular. Em poucos minutos de imersão, é estabelecido um gradiente de concentração linear entre a solução e o hidrogel devido à diferença de concentração dos metais presentes no meio e no sensor, de acordo com a Primeira Lei de Difusão de Fick. O meio de ligação adsorve as espécies que se difundiram no sensor. As espécies lábeis medidas são o íon livre presente na solução ou o íon livre oriundo da dissociação de complexos metálicos, dependendo da estabilidade e da cinética de dissociação destes complexos. Complexos grandes e estáveis tais como os formados entre íons metálicos e substâncias húmicas, assim como os metais associados ao material particulado e colóides, não são capazes de permear a camada difusiva e não contribuem na medida.

Portanto, o dispositivo DGT apresenta a capacidade de discriminar as espécies que sofrem difusão no hidrogel de acordo com a labilidade, com os coeficientes de difusão das espécies e com a cinética

de dissociação dos complexos durante o tempo da medida (Gimpel et al., 2003). A Figura 17 que segue mostra a representação esquemática do dispositivo DGT evidenciando seus principais componentes.

Figura 17: Esquema representativo do dispositivo DGT comercial



A concentração da espécie metálica acumulada na resina em um tempo adequado pode ser determinada por uma técnica instrumental depois de uma etapa de eluição ácida (Zhang e Davison, 1995). Da maneira que ocorre a acumulação das espécies no DGT e o processo de extração dos analitos, que envolve a utilização de pequenos volumes de solução ácida, pode-se estabelecer um sistema de pré-concentração de espécies de interesse. De acordo com Zhang e Davison (1995), a aplicação do DGT durante um dia no ambiente aquático pode resultar em um fator de concentração de aproximadamente 300 vezes. Tal situação permite realizar medidas em concentrações bastante baixas, na ordem de pmol L⁻¹. Esse processo de pré-concentração apresenta duas vantagens. A primeira refere-se ao aumento de sensibilidade que proporciona a detecção de concentrações bastante reduzidas de espécies lábeis. O segundo aspecto está relacionado com o fato que ocorre a extração da espécie de interesse da matriz, minimizando interferências nas medidas.

Para realização das medidas, os dispositivos são montados em laboratório, transportados para o campo, onde são aplicados por um período de tempo adequado. Em seguida são recolhidos, desmontados e a camada adsortiva é submetida a uma eluição com solução ácida, sendo em seguida realizada a determinação das espécies por uma técnica analítica instrumental adequada, como por exemplo a espectrometria de emissão ótica em plasma acoplado indutivamente (Chostak et al, 2015).

f) Elementar (material particulado em suspensão)

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 e S) nos sedimentos deste estudo deverão ser realizadas em amostras de material particulado em suspensão (MPS) e sedimento.

- Pré-tratamento

As amostras de água coletadas em garrafas de 1L serão filtradas em membrana de fibra de vidro para retenção no material particulado em suspensão que será analisado posteriormente.

- Procedimento

Para a análise da composição elementar da matéria orgânica é realizada a descarbonatação, através da adição de HCl 1M diretamente nas amostras dentro dos tubos de centrifugação (Tipo FALCON). Este procedimento deverá ser então repetido por duas vezes sendo as amostras lavadas, centrifugadas e liofilizadas.

A determinação dos teores de carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT) e enxofre total (ET) deverá ser realizada com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando um analisador elementar. As amostras são pesadas em cápsulas de estanho em balança analítica de precisão (0,001mg) e são posteriormente inseridas no equipamento para quantificação. Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico deverão ser realizados com padrão certificado de sulfanilamida.

- Quantificação em Analisador Elementar CHNS

Para as análises é realizada uma curva de calibração por meio de padrão de sulfanilamida com massa elementar conhecida, com 6 concentrações entre 0,5 mg a 1,5 mg. O padrão é pesado nas cápsulas de estanho e analisado antes das amostras, que somente serão analisadas caso a curva padrão apresentar uma boa regressão ($r > 0,99$). Para controle da qualidade analítica e replicabilidade, são ainda analisados brancos e amostras em triplicata. Após a inserção das cápsulas de estanho no auto-amostrador, os resultados são verificados por software no computador e posteriormente tratados em relação a massa obtida para cada elemento e validados pelo coeficiente de variação (<10%).

g) Isótopos (material particulado em suspensão)

A determinação dos isótopos estáveis de C e N (razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) será feita em amostras descarbonatas, com o seguinte procedimento: os filtros contendo material particulado ficarão sob atmosfera saturada em vapores de HCl durante 24h (Hedges and Stern, 1984), e em seguida serão retiradas sub-amostras de cada filtro. As determinações de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ serão realizadas em triplicata para o caso de material particulado em suspensão.

A determinação das razões isotópicas – nas amostras já descarbonatadas - serão realizadas em espectrômetro de massa isotópica acoplado a analisador elementar, onde é feita a combustão. Os compostos orgânicos, queimados na presença de oxigênio ultrapuro e de catalisador, são transformados em CO_2 e N_2 e H_2O . A água é retirada por uma coluna contendo perclorato de magnésio anidro, e o CO_2 e N_2 são separados por cromatografia gasosa em uma coluna de peneira molecular. Os gases separados são então introduzidos em um espectrômetro de massas dedicado que determina a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Os resultados são obtidos inicialmente relativos a

padrões secundários de trabalho para depois serem expressos em relação ao carbonato da formação Pee Dee (Belemnite) para $\delta^{13}\text{C}$ e em relação ao N_2 atmosférico para $\delta^{15}\text{N}$. A precisão da análise é de 0,1‰.

4.2.2. Matriz sedimento superficial

A coleta de sedimento superficial será realizada com um amostrador de fundo do tipo Box Corer. A amostra deverá ser recebida em uma bandeja limpa para ser fotografada e subamostrada. Caso haja a ocorrência de lama alaranjada na superfície da amostra, esta deverá ser registrada e sua espessura mensurada com uma régua.

a) Aspectos físicos (Granulometria e Mineralogia)

- Remoção de sal

Lavar com água da torneira cada amostra bruta, separadamente, 3 vezes para a retirada do sal. Após a remoção do sal, 2/3 da amostra ainda úmida serão destinados à análise granulometria e 1/3 à análise do teor de carbonato.

- Separação das frações fina e grossa

A separação das frações fina (silte + argila) e grossa (areia + cascalho) é feita via úmida em 2 peneiras de 0.63 μm sobrepostas. O sedimento deve ser colocado ainda úmido (após remoção de sal) dentro da peneira superior (se necessário, pouco a pouco). Lavar, pouco a pouco, com água da torneira por meio de uma pisseta com o auxílio das mãos (delicadamente). Terminada a lavagem, o sedimento retido na peneira (fração grossa) deve ser transferido para outro becker previamente pesado.

O becker contendo a fração fina deve ser deixado em repouso até completa deposição do sedimento em suspensão. Após o excesso de água deve ser drenado com uma mangueira e separado em duas partes:

Cerca de uma colher de sopa de sedimento deve ser transferido para um becker e seco à 40°C (aproximadamente 24h) em estufa para ser enviado para análise de mineralogia (≈ 10 g). Após seco, o sedimento deve ser devidamente identificado e enviado imediatamente para os responsáveis da análise.

O restante da amostra deve seguir para remoção da matéria orgânica por queima com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%.

O becker contendo a fração grossa deve ser levado à estufa a 40°C para secagem da amostra. Após seco, o sedimento deve ser pesado e seguirá para o fracionamento via seca.

- Fração fina

Queima da matéria orgânica com H_2O_2 : em uma capela de exaustão de gases, posiciona-se o becker contendo a fração fina sobre uma chapa aquecedora (à $70^\circ C$) e adiciona-se o H_2O_2 à amostra com o auxílio de uma pisseta até que a reação termine. Após adição do H_2O_2 , deixa-se o becker sobre a chapa aquecedora ligada por, no mínimo, 6h. Terminadas as 6h, checar se o sedimento ainda irá reagir com a adição de mais H_2O_2 . O procedimento de queima deve continuar até que não haja mais reação (borbulhamento) com a adição de mais H_2O_2 ao sedimento. Terminada a queima, a amostra deve ser lavada 3 vezes no próprio becker seguindo o mesmo procedimento descrito para a remoção de sal (lavagem seguida de decantação). Terminada a remoção do H_2O_2 , a água deve ser drenada com uma mangueira. Após, o sedimento deve ser enviado ainda úmido para análise de granulometria no Malvern Mastersizer (granulômetro à laser).

- Fração grossa

Fracionamento da fração grossa via seca: após seco, o sedimento de cada amostra deve ser colocado em uma torre de peneiras com intervalo de granulometria de 0,5 phi. As peneiras devem ser alinhadas de forma que a maior porosidade fique no topo e a menor, na base da torre. Colocar cerca de 40 g de sedimento no topo e colocar a torre em agitação por 15 minutos. Terminada a agitação, o sedimento retido em cada peneira deve ser pesado em uma balança de precisão.

- Mineralogia

A determinação mineralógica na fração lamosa será realizada pelo método da difratometria de raios-x, utilizando-se a metodologia convencional, com radiação Cu-K alfa (comprimento médio $\langle \lambda \rangle = 0.15419$ nm) e geometria Theta/2Theta Bragg-Bretano. A amplitude angular utilizada varia de 3.00° a 90.00° , com intervalos de 0.04° , utilizando Cu-K alfa duplo, com comprimento de onda 0,154056 (65%) e 0,154439 (35%). Um monocromador LiF será incorporado no detector de radiação. Para a determinação das características do equipamento e leitura do branco, uma amostra padrão NIST Si será mensurada antes das medições das amostras.

- Densidade

Pesar os potes com sedimento em balança com precisão de 4 casas decimais. Colocar os potes levemente abertos, previamente pesados, em estufa à $40^\circ C$ por 48 horas. Terminadas as 48 horas, checar visualmente se o sedimento se encontra seco e proceder novamente para pesagem.

b) Teor de carbonato de cálcio ($CaCO_3$)

Cerca de 20 g da amostra bruta deve ser novamente separada via úmida como descrito acima e as duas frações seguem separadamente para a remoção do $CaCO_3$ como descrito abaixo.

➤ Fração grossa: após separação, a fração grossa deve ser transferida para um becker (previamente pesado) e seca à $40^\circ C$. Depois de seca, a fração grossa deve ser pesada em uma balança de precisão e o peso do sedimento (peso sedimento + becker – peso do becker) deve ser anotado. Após, o becker contendo o sedimento seco e já pesado deve ser colocado em uma capela

de exaustão de gases para a adição lenta e gradual de HCl (30%) com o auxílio de uma pisseta. O procedimento continua até que a adição de HCl não provoque mais reação. Terminada a queima do carbonato, o sedimento deve ser lavado 3 vezes com água e seco em estufa à 40°C. Após seco, o becker com o sedimento é novamente pesado e o teor de carbonato de cálcio será o sedimento pré-queima subtraído do sedimento pós-queima corrigido para porcentagem.

➤ Fração fina: a fração fina deve ser deixada em repouso para decantação com posterior drenagem. Após o dreno, a amostra segue como descrito acima para a queima do CaCO₃ da fração grossa.

c) Teor de matéria orgânica total (MOT)

Separar cerca de 2 g de sedimento bruto (aproximadamente 1 colher de chá) em um becker limpo e levar à estufa para secar a 40°C por 24h. Terminadas as 24h, checar visualmente se o sedimento se encontra seco. Após, pesar o sedimento seco em balança de precisão e colocar o sedimento pesado em um cadinho de porcelana (limpo e previamente pesado) identificado à lápis para queimar em Mufla a 450°C por 4h. Terminadas as 4h, colocar o cadinho de porcelana contendo o sedimento para esfriar em um dessecador por, no mínimo, 1h. Após, pesar o cadinho de porcelana contendo o sedimento em uma balança de precisão.

A massa de matéria orgânica total será o peso do sedimento antes de ser levado à Mufla subtraído do peso do cadinho de porcelana e do sedimento após queima (MOT =sedimento pré-queima – sedimento pós-queima – cadinho de porcelana). O teor será a conversão deste valor em porcentagem. Planilhar o teor de MOT referente a cada amostra.

d) Nutrientes

Especiação de fósforo (incluindo orto-fosfato em água intersticial):

No método proposto para a especiação de fósforo, a primeira fração extraída (P-trocável) contempla o parâmetro orto-fosfato presente na água intersticial, portanto não há a necessidade de descrever esta análise separadamente. Desta forma, o valor de concentração obtido para esta fração é a concentração de orto-fosfato em água intersticial.

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 no Quadro 45 abaixo e cada extrato deverá ser analisado por colorimetria segundo métodos da EPA descritos anteriormente:

Quadro 45. Etapas de extração e cada extrato a ser analisado por colorimetria.

Fração extraída	Extrator (tempo)	Reação química
P-trocável	$\text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{tolueno}$ 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	ditionito citrato bicarbonato 4h	Dissociação de óxido de Fe(III) redutível e P associado.
P-ligado a hidroxiapatita autigênica	NH_4Cl (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_2SO_4 (18M) 16h	Dissociação ácida da matéria orgânica.

- Material

Vidraria volumétrica propriamente limpas com o uso de Extran, depois lavadas com ácido clorídrico 10% e água ultrapura.

- Reagentes

Os reagentes utilizados neste procedimento estão descritos no Quadro 45.

- Procedimento

O presente método começa com a medição do fosfato dissolvido em água intersticial. Essa água é removida do sedimento através da centrifugação com o uso de tubos de polipropileno de 50mL (tipo FALCON). O sobrenadante será filtrado em membrana de acetato de celulose 0,2 μm ou 0,45 μm quando a primeira não estiver disponível.

A fração P-trocável precederá com a adição de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) em dois litros de água ultrapura até o pH próximo da água do mar ($\approx 8,2$). O tolueno (1mL L^{-1}) pode ser adicionado para evitar atividades bacterianas. Cerca de 50mg de amostra homogeneizada será pesada em tubos de centrifugação (50mL) e será adicionado 50mL da água tampão descrita acima e acondicionada em um agitador em temperatura ambiente por 24h. Após esse período, as amostras serão centrifugadas por 15 minutos a 4000 RPM. Cerca de 10mL do sobrenadante será analisada para fosfato.

P-ligada a ferro (III) amorfo será analisado em cerca de 100mg de amostra seca em tubos de centrifugação (15mL). Cerca de 50g de citrato de sódio e 50g de bicarbonato de sódio serão diluídos em 1L de água ultrapura e a solução aerada em fluxo de nitrogênio por cerca de 5 minutos. Adicionar

vagarosamente 20g de ácido ascórbico. Uma solução de HCl 0,2M deve ser preparada com a diluição de 17,7mL de HCl concentrado em 1L de água ultrapura. Cerca de 10mL da solução de ascorbato será adicionado nas amostras pesadas nos tubos de centrifugação e condicionadas a agitação por 24h. as amostras serão centrifugadas por 15 minutos a 4000 RPM. Uma alíquota de 1mL da amostra será adicionada a 9mL de HCl 0,2M (1:10) e analisada para fosfato.

No caso do P-ligado a ferro (III) cristalino, a extração será realizada em cerca de 100mg de sedimento seco em tubos de 15mL. Pesar cerca de 44,119g de citrato de sódio e 42,011g de bicarbonato de sódio em 1L de água ultrapura para preparação de uma água tampão. Adicione 10mL dessa água tampão e 0,5625g de diotinito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) em cada amostra. Prepare ao menos três brancos. Borbulhe N_2 , feche os tubos e agite por 4h. Centrifugue por 15 minutos a 4000 RPM. Uma alíquota de 1mL da amostra será adicionada a 9mL de HCl 0,2M (1:10) e analisada para fosfato. O valor encontrado precisa ser subtraído dos valores de P-ligada a ferro (III) amorfo para real concentração de P-ligado a ferro (III) cristalino.

P-ligado a hidroxiapatita autigênica será extraída nas amostras após o procedimento P-ligado a ferro (III) cristalino. O tubo com amostra será limpo com o uso de cloreto de magnésio (MgCl_2) 1M a pH 8, sendo a solução descartada cuidadosamente. Pesar 106,98g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em frascos de polipropileno de 2L, sendo adicionado 1L de água ultrapura e depois adicionar NaOH até pH 7. Adicionar 10mL dessa solução nas amostras e condicionar em agitação por 16h. Posteriormente, centrifugar por 15 minutos a 4000 RPM. Uma alíquota de 1mL da amostra será adicionada a 9mL de HCl 0,2M (1:10) e analisada para fosfato.

P-ligado a apatita carbonática autigênica será extraída nas amostras após o procedimento P-ligado a ferro (III) cristalino e P-ligado a hidroxiapatita autigênica descritos anteriormente. Dessa forma, 136,08g de acetado de sódio será pesado em um frasco de polipropileno e adicionado 1L de água ultrapura. Adicionar ácido acético até pH abaixo de 4. Assim, adicionar 10mL dessa solução nas amostras presentes nos tubos de centrifugação (15mL) e condicionar em agitação por 16h. Posteriormente, centrifugar por 15 minutos a 4000 RPM. Uma alíquota de 1mL da amostra será adicionada a 9mL de HCl 0,2M (1:10) e analisada para fosfato.

P-ligado a apatita detrital e carbonato será extraída na amostra após a realização dos procedimentos anteriores. Diluir 80,7mL de HCl concentrado em 800mL de água ultrapura e após esfriar, afira para 1L. adicionar 10mL dessa solução nas amostras presentes nos tubos de centrifugação (15mL) e condicionar em agitação por 16h. Posteriormente, centrifugar por 15 minutos a 4000 RPM. Uma alíquota de 1mL da amostra será adicionada a 9mL de água ultrapura (1:10) e analisada para fosfato.

P-orgânico será extraído após os procedimentos anteriores. Assim, cuidadosamente adicione 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado (18M; 97-99%) nas amostras presentes nos tubos de centrifugação (15mL). Tampar e agitar por 16h. Após esse período, esfriar os tubos em banho de água e diluir em três vezes com a adição de 5mL de água ultrapura. Agitar cuidadosamente os tubos e centrifugar por

15 minutos a 4000 RPM. Pipetar 210 μ L do sobrenadante em tubos de centrifugação limpos e adicionar 10mL de água ultrapura. Fosfato será analisado na diluição final (1:144).

Entre cada procedimentos, os tubos com amostra serão limpos com o uso de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 1M a pH 8, sendo a solução descartada cuidadosamente para os procedimentos posteriores. Somente para a preparação da extração do P-orgânico, os tubos devem ser lavados com água ultrapura, centrifugados e o sobrenadante cuidadosamente descartado.

e) Metais

- Metais parciais

Para análise de metais parciais será utilizado o método EPA 3051A (Extração parcial). 0,25g de sedimento será liofilizado e macerado (gral e pistilo de ágata), sendo adicionado 10ml de HNO_3 destilado (*sub-boiling*) e aquecidas em forno micro-ondas seguindo os parâmetros: 1ª rampa de temperatura 25°C a 175°C em 5:30min. e a 2ª rampa de 25°C a 175°C em 4:30min., ambas em potência de 1600 W. Em seguida, a solução será resfriada e filtrada em filtro quantitativo e posteriormente diluída para 100mL em balão volumétrico, procedendo-se então a análise por ICP-MS.

- Extração sequencial de metais

Análise de metais nas diferentes frações presentes nos sedimentos será realizada através da extração sequencial proposta por Tessier et al., (1979) ou o proposto no método BCR (Quadro 46). Este método propõe a quantificação de metais presentes em 4 a 5 frações distintas obtidas pela eluição sequencial de uma mesma amostra sedimentar. Os metais nos diferentes extratos obtidos serão quantificados em ICP-MS (EPA 6020A). Ressalta-se que as frações F1 e F2 são obtidas (suprimidas) em um único extrato no método BCR, sendo, portanto, 4 frações ao final.

Quadro 46. Comparação entre as diferentes frações obtidas pelo método de extração sequencial proposto por Tessier et. al. (1979) e método BCR.

Frações	Método de extração sequencial Tessier et al. (1979)	Componentes sedimentares extraídos Tessier et al. (1979)	Frações	Método de extração sequencial BCR	Componentes sedimentares extraídos BCR
F1 - Trocável	1 M $MgCl_2$, pH 7, 1 h	Íons trocáveis	F1 - Solúvel em ácido	0,11 M HOAc, 16 h	Íons trocáveis e carbonatos
F2 – Adsorvida/Carbonática	1 M NaOAc, pH 5 (HOAc), 5 h	Íons adsorvidos, carbonatos			
F3 - Redutível	0,04 M $NH_2OH \cdot HCl$ in 25% (v/v) HOAc, 6 h, 96°C	Óxidos de ferro e manganês	F2 - Redutível	0,1 M $NH_2OH \cdot HCl$, pH 2 (HNO_3), 16 h	Óxidos de ferro e manganês

Frações	Método de extração sequencial Tessier <i>et al.</i> (1979)	Componentes sedimentares extraídos Tessier <i>et al.</i> (1979)	Frações	Método de extração sequencial BCR	Componentes sedimentares extraídos BCR
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% HNO ₃ (v/v), 0,5 h	Sulfetos/Orgânicos	F3 - Oxidável	30% H ₂ O ₂ , pH 2 (HNO ₃), 2 h a 85°C, extraído com 1 M NH ₄ OAc pH 2 (HNO ₃), 16 h	Sulfetos/Orgânicos
F5 - Residual	HF – HNO ₃ – H ₂ O ₂	Metais ligados em minerais litogênicos	F4 - Residual	Aquecimento HF/HNO ₃ concentrado.	Metais ligados em minerais litogênicos

A abertura da amostra será realizada com o uso de aproximadamente 1 grama de sedimento seco (liofilizado) e homogeneizado (macerado em grau e pistilo de ágata) seguindo as seguintes etapas descritas por Tessier (1979):

- F1 – Trocável: O sedimento será extraído a temperatura ambiente por 1h com a adição de 8mL da solução de cloreto de magnésio (1M; MgCl₂; pH 7,0) ou solução de acetato de sódio (1M; NaOAc, pH 8,2) com agitação contínua.
- F2 – Adsorvida/Carbonática: O resíduo da F1 será extraído a temperatura ambiente com 8mL de 1M NaOAc com pH ajustado a 5,0 com o uso de ácido acético (HOAc) em constante agitação por um período de 5h.
- F3 – Redutível (Ligados a óxidos de Fe-Mn): O resíduo da F2 será extraído com adição de 20mL de 0,3 M Na₂S₂O₄ + 0,175 M citrato de sódio + 0,025 M ácido cítrico ou com 0,04 M NH₂OH·HCl em 25% (v/v) de HOAc em agitação ocasional, condicionado em temperatura a 96 ± 3°C por um período de 6h.
- F4 – Sulfídica/ orgânica: O resíduo da F3 será extraído com a adição de 3mL de ácido nítrico (HNO₃) a 0,02M e 5mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30%, com o pH ajustado para 2 com HNO₃. A mistura será aquecida a 85 ± 2°C por 2h com agitação ocasional. Após esse período, 3mL de peróxido de hidrogênio (30%; pH 2,0 com HNO₃) será adicionado e novamente aquecido a 85 ± 2°C por 3h com agitação intermitente. Após esfriar, 5mL de acetato de amônio (3,2M; NH₄OAc) em 20% (v/v) HNO₃ e a amostra diluída a 20 mL com água ultrapura e continuamente agitada por 30 minutos.
- F5 – Residual: O método original descrito por Tessier (1979) propõe o uso da solução com uma mistura de ácido fluorídrico e ácido perclórico. Contudo, no presente trabalho será utilizado a extração

com o uso de água-régia 3:1 (v/v) de ácido clorídrico: ácido nítrico (pseudo-total) como substituição ao previamente proposto.

- Metais totais e terras raras

A decomposição das amostras de sedimentos para análise metais terras raras será realizada pela abertura total da amostra proposto no método EPA 3052, utilizando HF destilado (*sub-boiling*) e HNO₃ destilado (*sub-boiling*) e H₂O₂ (30%; Merck). O procedimento será realizado tanto na fração do material particulado quanto nas amostras de sedimento.

A membrana saturada pelo MPS ou cerca de 0,5g de sedimento seco (liofilizado) e homogeneizado serão colocados em tubos de teflon e será adicionado 9 ± 1 mL de HNO₃, $3 \pm 0,1$ mL de HF e aproximadamente 1 mL de H₂O₂ (30%). As amostras serão aquecidas em forno micro-ondas com elevação de temperatura até 180 ± 5 °C em aproximadamente 5:30 minutos e mantido nesta temperatura por 9:30 minutos. Após o término do período de digestão ácida será adicionado ácido bórico (Merck) para a neutralização do HF e as amostras serão filtradas em filtro qualitativo e diluídas para análises em ICP-MS.

f) Compostos orgânicos

Extração de Hidrocarbonetos em sedimento

- Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas devem ser submetidas, previamente, a um procedimento de limpeza, visando evitar a contaminação das amostras, o que pode interferir nos resultados. Primeiramente, as vidrarias devem ser deixadas em banho de detergente Extran (5%) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada com água corrente, água destilada, água milli-Q, acetona e por fim calcinadas em mufla à 450°C por um período de 4 horas.

- Processamento das amostras

As amostras recebidas após as campanhas de coleta serão armazenadas em freezer (amostras de sedimento) até os procedimentos laboratoriais para análise. Amostras de sedimento recebidas serão 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 serão baseadas nos protocolos EPA 3540c - Soxhlet Extraction (EPA, 1996), EPA 8270d - Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (EPA, 2007). Aproximadamente 10 g de sedimento liofilizado e 2 g de cobre ativado para a remoção de enxofre molecular serão adicionados em cartuchos de celulose e extraídos em Soxhlet (12 h / 250 mL de diclorometano). A fim de verificar a eficiência de extração serão adicionados às amostras no início da extração, padrões surrogates deuterados (5 µg n-C20d, 5 µg n-C24d e 5 µg n-C30d e 100 ng de p-terfenil-d14) e androstanol (5 µg/mL). Após a obtenção do extrato bruto, este será 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 são 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) será 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 será eluída com 50 mL de acetato de etila e por último a fração contendo ácidos carboxílicos (F4) será eluída com 50 mL de metanol. As frações eluídas são concentradas em evaporador rotativo e o solvente trocado por hexano ajustado a aproximadamente 1 mL. Em seguida são adicionados respectivamente na F1 e F2 os padrões internos n-C16d (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 foram 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 será utilizado o alfa-colestano como padrão interno. A quantificação e identificação dos compostos será realizada através de um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c, ambos equipados com auto amostradores CTC Combi Pal, injetor Split/splitless e coluna capilar DB-5MS (30 m x 0.250 mm x 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP será 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-C16d – 10 µg / mL). A determinação quantitativa de HTP será 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 é 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 são 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 é realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas são 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 no Quadro 47. Os HPA serão determinados através do monitoramento full scan (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 serão utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. As curvas analíticas para esteróis e ácidos variam de 0,5 ug/mL a 20 ug/mL. Os padrões de ácidos graxos utilizados são preparados partir de uma mistura contendo 37 ácidos graxos saturados e insaturados. Para a quantificação de esteróis e terpenóides são utilizados os padrões de dihidrocolesterol,

colesterol, estigmastanol, 5 α -colestano-3-ona, 5- α -colestano, coprostanol, 3 β -taraxerol, campesterol, lanosterol, 3 β -hidróxi-5 α -androstano, b-sitosterol, e estigmasterol.

Os demais compostos identificados serão determinados em função do padrão interno adicionado, devido a inexistência de padrões comerciais referentes as classes a serem avaliadas.

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

Quadro 47. 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 à resposta analítica do sistema cromatográfico serão feitas com injeções dos padrões durante as análises das amostras de sedimento. Nestes ensaios será utilizado 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 são realizados como controle de garantia das análises.

Valores de recuperação obtidos na faixa entre 70 e 120 % são considerados aceitos como índices de bom desempenho analítico para o método. Cada batelada de extração deve 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,

serão realizadas análises de amostras de sedimento certificado de referência (Standard Reference Material NIST 1941b).

Extração de Éter-aminas e aminas aromáticas

- Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas devem ser submetidas, previamente, a um procedimento de limpeza, visando evitar a contaminação das amostras, o que pode interferir nos resultados. Primeiramente, as vidrarias devem ser deixadas em banho de detergente Extran (5%) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada com água corrente, água destilada, água milli-Q, acetona e por fim calcinadas em mufla à 450°C por um período de 4 horas.

Amostras de sedimento liofilizado (10 g) fortificados com trifetilamina são extraídas com diclorometano por sonicação (3 x 15 mL) ou por Soxhlet (250 mL) por 12 horas (metodologia baseada em Alzaga et al. 1999) e o extrato total pré-concentrado com fluxo de nitrogênio e armazenado para posterior análise.

A determinação quantitativa das aminas será realizada por cromatografia em fase gasosa equipado com um espectrômetro de massas e amostrador automático. Injeção realizada no modo splitless, (ativação em 40 s em 280°C). Hélio utilizado como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno 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. Colunas analíticas utilizadas: DB-5 de 30m, ID 0,25 mm e espessura de filme 0,25 mm (J & W Scientific). GC-MSD no modo eV EI operando no modo full scan (40-550 uma), temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente. Para a quantificação de aminas serão utilizados padrões de alta pureza dos seguintes compostos: n-ethyl-n-(4-methylphenyl)amine, trifetilamina, n-(4-clorofenil)-1,2-fenilenodiamina, isoamilamina, m-dpeg@8-amine, dodecilamina, dimethyl-d6-amine hydrochloride.

- Determinação de fenóis em sedimento:

O método analítico para os fenóis, descrito abaixo, é baseado e adaptado das metodologias EPA 3630 Silica Gel Cleanup; EPA 3540c Soxhlet Extraction, EPA 8270C Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), EPA8041a Phenols By Gas Chromatography e EPA5021a Volatile Organic Compounds In Various Sample Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis.

- Resumo

A massa de 10g de amostra liofilizada é extraída com 250 mL de diclorometano em Soxhlet com cartuchos de celulose, conforme descrito em outros protocolos e o processo de fracionamento como apresentado a seguir. Alternativamente pode-se utilizar o processo de extração por Headspace que baseia-se na extração de fenóis derivatizados, por aquecimento de 2 g de amostra em 10 mL de água com cloreto de sódio. No caso de extração por Soxhlet, após a concentração dos extratos é

necessário o processo de fracionamento e pré-concentração dos analitos (clean up) em coluna cromatográfica por adsorção em fase sólida-líquida para posterior análise em GC/MS.

- Purificação e Fracionamento (EPA 3630):

A purificação/fracionamento do extrato de fenóis é obtida por cromatografia líquida de adsorção em coluna de sílica:

Com o auxílio de um funil para sólidos, preencher a coluna cromatográfica (10 mm) com 4g de sílica (pré-limpa e desativada a 5%) pesada em aproximadamente 20 mL de hexano. O empacotamento deve ser homogêneo eliminando a formação de “canais” preferenciais de drenagem do solvente;

Depositar aproximadamente 1 cm de Na₂SO₄ (pré-limpo e seco) no topo da coluna a fim de assegurar a remoção de água do extrato. Não deixar, entretanto, que o adsorvente seja exposto ao ar;

O extrato (1 mL) é então transferido cuidadosamente para a coluna com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Para garantir a transferência total do extrato, lavar o vial contendo a amostra com hexano (0,5mL) e transferir para a coluna. Repetir a lavagem pelo menos 3 vezes, tomando o cuidado de não usar mais do que 2 mL de hexano na lavagem;

- Serão obtidas quatro frações:

- F1: 10 mL de 15% de tolueno em hexano;
- F2: 10 ml de 40% de tolueno em hexano;
- F3: 10 mL de 75% em tolueno;
- F4: 10 mL de 15% de 2-propanol em tolueno

O fluxo da eluição para as frações deve ser de aproximadamente 1 gota por segundo na torneira da coluna cromatográfica.

Juntar todas as frações em um único volume;

Concentrar o extrato até 1 mL em evaporador rotativo e fluxo de nitrogênio.

- Derivatização:

- Adicionar 40 uL do agente BSTFA:TMCS (99:1) aquecendo a solução à 65°C em estufa por 1 hora, para formar os derivados trimetilsilanos (TMS) dos analitos fenólicos;
- Secar novamente a solução em fluxo de nitrogênio;
- Adicionar 1 mL de hexano.
- Proceder com a análise Cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS) ou cromatógrafo gasoso com detector de ionização por chama (GC/FID).

- Método alternativo - extração por headspace (EPA 5021a)

Alíquotas de 2 g da amostra são adicionadas em frascos de headspace de 22 mL com 10 mL de água. Em seguida adiciona-se 4 g de cloreto de sódio, 0,4 g de carbonato de potássio e 100 µL de anidrido acético. Após adição destes reagentes o vial deve ser hermeticamente selado com tampas de alumínio e septo de PTFE faceado com silicone. As amostras são então levadas para o Auto amostrador Headspace que procede com o processo de extração por agitação e aquecimento.

- Análise instrumental

- Cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS EPA 8270)
- As condições instrumentais de operação são as seguintes:
 - Coluna cromatográfica capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno com fase de 5% fenil / 95%metil siloxano e 0,25 µm de espessura do filme;
 - Gás carreador: hélio
 - Temperatura da fonte: 200°C
 - Impacto eletrônico: 70eV
 - Temperatura da Interface: 280°C
 - Temperatura do injetor: 280°C
 - Modo de injeção: split, razão do split 1/10
 - Volume de injeção: 1µL

Programação temperatura: temperatura inicial de 50oC por 2 minuto, 35oC min⁻¹ até 100o, 10oC min⁻¹ até 310oC e isotérmico por 10 minutos.

- Análise instrumental GC-FID/PID-HS e GC-MS/HS (EPA 5021a)

As análises serão realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado com detectores de fotoionização (PID) e ionização em chama (FID) acoplados em série, equipado com injetor split/splitless, e lâmpada de criptônio de 10,6 eV. Os parâmetros experimentais utilizados serão os seguintes: coluna DB-5MS 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme, programa de temperatura (70 °C durante 5 minutos, aquecimento até 120°C / 8°C min⁻¹, até 135°C / 2°C min⁻¹ e finalmente até 280°C / 8°C min⁻¹). Hélio utilizado como gás de arraste com a vazão de 2,0 mL min⁻¹. O injetor foi mantido a 270°C com purga de septo constante e programado para retornar a modo split após 3 minutos do início da corrida sob a vazão de 50 mL min⁻¹. Os detectores PID e FID são programados a 250 e 280°C respectivamente. Também poderá ser utilizado alternativamente um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c operando em condições semelhantes às do GC-PID/FID: coluna de mesmas dimensões e fase estacionária, mesma programação de temperatura e

condições do injetor, com apenas uma redução na vazão do gás de arraste hélio (1 mL min⁻¹). Linha de transferência mantida a 280°C. O espectrômetro é configurado para aquisição de íons positivos por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV. e scan na faixa de razão massa/carga de 40 a 350 m/z. O detector mantém o filamento desligado (delay time) nos primeiros 5 min de aquisição. Ambos equipamentos dispõem de auto amostrador Headspace (HS) que viabiliza a extração dos compostos fenólicos derivatizados por volatilização e posterior injeção da fração gasosa no injetor dos cromatógrafos. No amostrador as amostras serão submetidas a agitação por 30 minutos sob a temperatura constante de 45°C. Após este período uma seringa retira uma alíquota de 1 mL da fração gasosa (Headspace) e leva para a porta do injetor.

- Quantificação

A quantificação dos compostos fenólicos é mediante curvas de calibração construídas com padrões analíticos na faixa de concentração que foram divididas dentro da faixa de 0,125 a 1000 µg L⁻¹ de uma solução mix de fenóis (aquilados, nitro e clorofenóis). Para amostras mais concentradas, curvas analíticas são construídas em níveis superiores de concentração, na ordem de mg L⁻¹, ou utiliza-se o método de diluição como alternativa para quantificação. Parâmetros de mérito são determinados tais como, faixa linear, coeficientes de correlação, precisão e limites de detecção e quantificação de maneira a avaliar o desempenho do método proposto para a determinação de compostos fenólicos em água. Coeficientes de correlação (R²) superiores a 0,99 para cada analito são utilizados como critério de qualidade. Frascos contendo apenas água ultrapura e reagentes derivatizantes são submetidos a extração e análise como controle e critério de qualidade e rastreabilidade dos processos analíticos. Também são avaliados diariamente a precisão da curva analítica através de cross check, injeção de padrões em diferentes concentrações como carta controle.

- Compostos organoclorados (OCs)

Toda a vidraria utilizada é lavada e deixada de molho em uma solução de detergente Extran alcalino por 12 horas, sendo posteriormente lavada com água corrente, água destilada e colocada para secar a 100°C em estufa para em seguida ser aquecida em forno mufla a 400°C durante 4h. Todo o material que não possa ser levado ao forno mufla, é lavado com solventes com alto grau de pureza (etanol, n-hexano e diclorometano - DCM) antes do seu uso.

Os adsorventes utilizados em todo o procedimento laboratorial (alumina e sulfato de sódio) são calcinados e armazenados em dessecadores, para que não estejam úmidos no momento do uso, na etapa de cromatografia de adsorção em coluna. O cobre utilizado para eliminar a interferência do enxofre na análise cromatográfica é previamente tratado antes do seu uso. Para tal, fios deste metal são imersos por 30 minutos em solução de ácido clorídrico (2 mol L⁻¹), enxaguados com água destilada, imersos em etanol e, por fim, enxaguados com mistura de DCM e n-hexano (1:1, v:v).

- Método analítico

A determinação dos compostos organoclorados (OCs) será realizada no Laboratório de Geoquímica Orgânica e Poluição Marinha (LaGPoM) do Centro de Estudos do Mar-UFPR. O método analítico utilizado para os sedimentos foi descrito em UNEP (1992), com pequenas adaptações (BÍCEGO et al., 2006), sendo que as etapas desse processo são divididas em tratamento prévio das amostras, citado anteriormente, extração, purificação e análise dos extratos por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). A metodologia para a extração dos compostos das amostras de água será baseada no protocolo EPA 3510C - Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction (USEPA, 1996).

Primeiramente, cerca de 20 g de cada amostra de sedimentos é separada para a extração. Esses sedimentos são colocados entre uma pequena quantidade de sulfato de sódio, dentro de cartuchos de vidro para extração em Soxhlet, durante 8 horas. Os compostos orgânicos são extraídos com 80 mL de uma mistura de DCM e n-hexano (1:1, v:v). Além disso, a cada frasco de extração é adicionado cobre ativado, para remover o enxofre inorgânico e 25 μL de uma mistura de padrões subrogados (PCB 103 e PCB 198, 1 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). As amostras de água serão extraídas em funil de separação, e consiste em adicionar 60 mL de DCM por 1 L da amostra, misturar por 2 min, sempre abrindo o frasco para aliviar a pressão interna, e transferir para o funil de decantação. Deve-se misturar as fases por 1 min e deixar repousar (decantar) por 10 min. A fase aquosa é descartada e a fase orgânica será utilizada para as próximas etapas da análise. Esse processo deve ser repedido 3 vezes. Nas amostras de água também será adicionada a mistura de padrão subrogados.

Após a etapa de extração em Soxhlet, as amostras são concentradas no rotavapor rotativo até 2 mL, e em seguida, é realizada a etapa de purificação por cromatografia de adsorção em coluna. Essas colunas são preparadas com sulfato de sódio e 3,2 g de alumina 5% desativada com água destilada (extraída 5 vezes com n-hexano, para assegurar a ausência de possíveis interferentes orgânicos), e a eluição com 20 mL de uma mistura de DCM e n-hexano (3:7, v:v). Por fim, os extratos são concentrados até 250 μL e nesse momento, é adicionado 25 μL de uma solução de tetracloro-m-xileno (TCMX, 1 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizado como o padrão interno. Em seguida, as amostras são armazenadas em ampolas de vidro para posterior determinação dos OCs através de cromatografia gasosa.

Para a determinação dos OCs, os extratos de 2 μL das amostras são injetados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectômetro de massa (GC-MS), no modo SIM (System Ion Monitoring), equipado com coluna capilar, com 30 m de comprimento, 0,25 μm de espessura do filme, 250 μm de diâmetro interno e fase estacionária de 5% fenil-metil-siloxana. São registrados apenas os picos relacionados aos dois principais fragmentos (m/z) característicos de cada um dos compostos analisados. A rampa de aquecimento utilizada na separação dos POPs tem início em 75°C, permanecendo por 3 min, quando começa a subir a uma taxa de 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 150 $^{\circ}\text{C}$, depois subir até 260 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e então sobe até 300 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, mantendo-se estável nessa temperatura por 10 min, totalizando 75 min.

- Quantificação e controle analítico

Os compostos investigados são os PCBs (8, 18, 28, 31, 33, 44, 49, 52, 56/60, 66, 70, 74, 87, 95, 97, 99, 101, 105, 110, 114, 118, 123, 128, 132, 138, 141, 149, 151, 153, 156, 157, 158, 167, 170, 174, 177, 180, 183, 187, 189, 194, 195, 201, 203, 206 e 209) e os pesticidas organoclorados (o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'- DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, HCB, α -Clordano, γ -Clordano, Oxiclordano, Heptacloro, Heptacloro Epoxido-a, Heptacloro Epoxido-b, Aldrin, Isodrin, Dieldrin, Endrin, Endosulfan II, Endosulfan I, Metoxicloro e Mirex).

Os picos obtidos no GC-MS são integrados por um sistema de aquisição de dados (HP Enhanced Chemstation G1701 CA). Para a quantificação são construídas curvas de calibração dos compostos, com concentrações da solução de padrões externos de pesticidas e PCBs de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$. Todos os compostos devem apresentar índice de correlação linear de Pearson igual ou superior a 99,5% ($r^2 \geq 0,995$), critério este utilizado para aceitação das mesmas. Todas as concentrações finais serão expressas em ng g^{-1} de sedimento seco, pela aplicação do fator de multiplicação obtido do quociente entre o volume final do extrato (250 μL) e a massa de sedimento extraída (20,0000 g).

A fim de identificar a presença de contaminantes durante o procedimento laboratorial, os brancos de extração são analisados a cada grupo de 11 amostras de sedimentos e água. Os valores encontrados devem ser três vezes menores que o limite de detecção do método (LDM), ou seja, não mostrar interferências externas significativas. Para estimar perdas ou ganhos de massa dos compostos analisados durante o procedimento analítico, o cálculo da recuperação dos padrões subrogados PCB 103 e PCB 198 é feita a partir da relação das suas quantidades obtidas com a quantidade adicionada de padrão interno TCMX. A recuperação deve estar dentro da faixa considerada aceitável para validação do método analítico (entre 40 e 120%).

O limite de detecção de um método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 95% de confiança, e essa concentração é diferente de zero e pode ser determinada em uma matriz contendo o analito. Nesse método, o LDM é calculado através da quantificação de uma pequena quantidade de analitos adicionados a uma matriz que não contém os compostos em estudo. O cálculo para determinação do limite de detecção é de três vezes o desvio padrão dessa matriz em cinco replicatas.

A eficiência do método pode ser verificada através da análise de amostras de intercomparação (IAEA-383) preparado pela Marine Environmental Laboratory of International Atomic Energy Agency (MEL/IAEA). De acordo com o critério de aceitação, a metodologia é considerada confiável se 80% dos compostos analisados estiverem dentro da faixa apresentada no certificado, acrescido de $\pm 35\%$.

- Elementar (sedimento superficial)

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 e S) nos sedimentos deste estudo deverão ser realizadas em amostras de material particulado em suspensão (MPS) e sedimento.

- Pré-tratamento

As amostras de sedimento a serem analisadas serão liofilizadas e maceradas em gral e pistilo de ágata antes da descarbonatação.

- Procedimento

Para a análise da composição elementar da matéria orgânica é realizada a descarbonatação, através da adição de HCl 1M diretamente nas amostras dentro dos tubos de centrifugação (Tipo FALCON). Este procedimento deverá ser então repetido por duas vezes sendo as amostras lavadas, centrifugadas e liofilizadas.

A determinação dos teores de carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (NT) e enxofre total (ET) deverá ser realizada com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando um analisador elementar. As amostras são pesadas em cápsulas de estanho em balança analítica de precisão (0,001mg) e são posteriormente inseridas no equipamento para quantificação. Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico deverão ser realizados com padrão certificado de sulfanilamida.

- Quantificação em Analisador Elementar CHNS

Para as análises é realizada uma curva de calibração por meio de padrão de sulfanilamida com massa elementar conhecida, com 6 concentrações entre 0,5 mg a 1,5 mg. O padrão é pesado nas cápsulas de estanho e analisado antes das amostras, que somente serão analisadas caso a curva padrão apresentar uma boa regressão ($r > 0,99$). Para controle da qualidade analítica e replicabilidade, são ainda analisados brancos e amostras em triplicata. Após a inserção das cápsulas de estanho no auto-amostrador, os resultados são verificados por software no computador e posteriormente tratados em relação a massa obtida para cada elemento e validados pelo coeficiente de variação (<10%).

- Isótopos (sedimento superficial)

A determinação dos isótopos estáveis de C e N (razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) será feita em amostras descarbonatadas, com o seguinte procedimento: o sedimento será descarbonatado com adição cuidadosa de HCl (10%) diretamente em cápsulas de prata contendo cerca de 10 mg de amostra. As determinações de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ serão realizadas em duplicata.

A determinação das razões isotópicas – nas amostras já descarbonatadas - serão realizadas em espectrômetro de massa isotópica acoplado a analisador elementar, onde é feita a combustão. Os compostos orgânicos, queimados na presença de oxigênio ultrapuro e de catalisador, são transformados em CO_2 e N_2 e H_2O . A água é retirada por uma coluna contendo perclorato de magnésio anidro, e o CO_2 e N_2 são separados por cromatografia gasosa em uma coluna de peneira molecular. Os gases separados são então introduzidos em um espectrômetro de massas dedicado

que determina a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Os resultados são obtidos inicialmente relativos a padrões secundários de trabalho para depois serem expressos em relação ao carbonato da formação Pee Dee (Belemnite) para $\delta^{13}\text{C}$ e em relação ao N_2 atmosférico para $\delta^{15}\text{N}$. A precisão da análise é de 0,1‰.

4.2.3. Matriz sedimento testemunho

Os testemunhos serão coletados em duas réplicas sendo que uma delas, de cada ponto amostral, será resfriado e a outra réplica será congelada. Os testemunhos resfriados serão abertos em duas metades (lado A e lado B), fotografados e subamostrados a cada centímetro. Estas amostras serão destinadas às análises de granulometria, teor de carbonato de cálcio, matéria orgânica, mineralogia e minerais pesados. Os tubos congelados serão subamostrados também a cada centímetro, entretanto, não será aberto em duas metades para evitar seu descongelamento. Estes tubos serão subamostrados empurrando-se o material por um lado do tubo enquanto que do outro lado o sedimento é subamostrado. Estas amostras serão destinadas às análises geoquímicas..Todas as amostras referentes aos testemunhos congelados e resfriados serão liofilizadas antes das análises subsequentes.

a) Aspectos físicos (Granulometria e Mineralogia)

- Granulometria

A análise granulométrica deverá ser realizada em amostras a cada dois centímetros através do peneiramento à úmido, inicialmente, para separação da fração fina (lama) e grossa (areia). Toda a amostra (correspondente a um centímetro) devidamente liofilizada deverá ser pesada antes de ser submetida a separação das frações fina e grossa. A continuidade desta análise deverá seguir o mesmo protocolo para esta análise descrito para a Matriz sedimento superficial.

- Mineralogia

A mineralogia deverá ser realizada por difratometria de raio-x de acordo com o protocolo descrito para a Matriz sedimento superficial em pelo menos 10 amostras ao longo do registro sedimentar e na alíquota remanescente de lama separada inicialmente durante a análise granulométrica.

b) Teor de carbonato de cálcio (CaCO_3)

A análise do teor de carbonato de cálcio deverá ser realizada em amostras a cada dois centímetros (intercalando-se com as amostras destinadas para a análise granulométrica) em uma metade da amostra, ou seja, lado A ou lado B seguindo o mesmo protocolo para esta análise descrito para a Matriz sedimento superficial. A quantidade a ser analisada corresponde a toda a metade da amostra liofilizada previamente a esta análise.

c) Minerais pesados

A análise de minerais pesados deverá ser realizada na alíquota remanescente da dissolução de carbonato de cálcio através do método gravitacional utilizando-se líquido denso bromofórmio. Após a separação, os minerais devem ser limpos dos resíduos dos líquidos densos utilizando-se álcool etílico.

d) Teor de matéria orgânica total (MOT)

O teor de matéria orgânica deverá ser realizada em amostras a cada dois centímetros (intercalando-se com as amostras destinadas para a análise granulométrica) em uma metade da amostra, ou seja, lado A ou lado B seguindo o mesmo protocolo para esta análise descrito para a Matriz sedimento superficial. A quantidade a ser analisada corresponde a toda a metade da amostra liofilizada previamente a esta análise.

e) Metais

As amostras utilizadas para este ensaio devem ser previamente liofilizadas.

- Pesar 0,500 g de amostra de sedimento previamente liofilizada em balança analítica
- Transferir as amostras para os tubos do bloco digestor em capela.
- Adicionar 4,5 ml de HCL e 1,5 ml de HNO₃
- Tampar os tubos digestores com vidro de relógio e deixar em repouso por 16 hs.
- Aquecer as amostras a 85±5°C por 2hs com agitação ocasional, com os tubos tampados com vidro de relógio.
- Após 2 hs desligar o bloco digestor e aguardar o resfriamento dos tubos
- Filtrar as amostras a vácuo com membrana de acetato de celulose de porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro e transferir para falcons de 50 ml.
- Avolumar as amostras nos falcons para 35 ml.
- Proceder com a leitura das amostras em espectrofotômetro de absorção atômica em método de chama.

Branco e certificação:

Para cada bateria no bloco digestor (20 tubos) 2 unidades deverão ser separadas para branco e padrão certificado.

Para o branco deve ser adicionado ao tubo apenas os ácidos (4,5 ml de HCL + 1,5 ml de HNO₃). O branco também deverá ser filtrado e avolumado para posterior leitura.

O padrão certificado utilizado é o BCR 701®, que deverá ser tratado da mesma forma que a amostra. Pesar 0,500 g de padrão e adicionar ao tubo do bloco do digestor, seguido da adição de ácidos (4,5 ml de HCL + 1,5 ml de HNO₃). Após a digestão, o padrão também deverá ser filtrado e avolumado no falcon para posterior leitura. O procedimento de extração segue as recomendações de Ure et al. (1993), Lerner et al. (2006) e Silva et al. (2014).

4.2.4. Matriz biota

a) Fitoplâncton

- Amostras qualitativas

Em laboratório, será realizado um levantamento de todas as amostras coletadas em campo. As amostras qualitativas coletadas em frascos de polietileno de 250mL serão sedimentadas por aproximadamente um dia ou até sedimentação total do material particulado, e parte do sobrenadante e material sedimentado serão transferidos para frasco cilíndrico de vidro 100mL, etiquetado com informações referentes ao ponto onde foi coletada. De forma semelhante, amostras coletadas em frascos escuros de 150mL serão transferidas para frascos escuros de 78mL. A sedimentação ocorrerá no próprio frasco, após transferências serão armazenadas em ambiente abrigado de luz, estando disponíveis para serem analisadas. Será recomendada avaliação periódica das amostras fixadas para reposição do fixador, se necessário.

A análise qualitativa do material coletado será em microscópio biológico óptico, equipado com câmera USB para registros de imagens e ocular de medição. Os organismos serão esquematizados, fotografados e identificados, analisando-se as suas características morfológicas e morfométricas. Bibliografia especializada será utilizada para identificação e classificação dos organismos fitoplancônicos. Na impossibilidade de se identificar os organismos em nível de espécie, os espécimes serão morfotipados de acordo com características morfométricas e morfológicas semelhantes e conforme maior dimensão linear. Uma análise crítica da lista de táxons será executada para confirmar a adequação da ficoflórula local, revisão e enquadramento taxonômico. Os nomes científicos das espécies encontradas nas amostras serão consultados junto ao banco de dados internacional ALGAEBASE (<http://www.algaebase.org/>).

Como procedimento para a análise qualitativa em microscópio será recomendado que:

- Monte um cronograma de análise em um arquivo incluindo informações sobre os pontos amostrais. O nome do analista deverá ser informado ao início da análise;
- Reserve uma amostra e porta ponteiras com 12 repartições contendo ponteiras em uma bandeja. Inclua também lâminas e lamínulas em uma folha de papel toalha, e micropipetador automático regulado em 25uL na bancada do laboratório. A ponteira e repartição da bandeja deverá ter indicação do ponto amostral a ser analisado;

- Separe um béquer de 10 mL com água destilada, pipeta de 3 mL, agulhas de seringas, lápis, borracha e ficha de análise qualitativa do fitoplâncton na região da bancada próxima ao microscópio onde será realizada a análise;
- Monte uma lâmina contendo a amostra utilizando um micropipetador automático com a ponteira acoplada. Ejete a ponteira previamente identificada na repartição correspondente da bandeja e guarde a micropipeta em posição vertical;
- Retire o excesso de amostra pipetada na lâmina com papel toalha para não umedecer o microscópio e dirija-se a ele;
- Retire a capa protetora do microscópio;
- Coloque a lâmina, ligue-o e aumente gradativamente sua luz;
- Em lente de menor objetiva mexa no macrométrico até encontrar algum “borrão”. Ajuste o foco com o micrométrico até ver a imagem limpa;
- Regule a distância entre as oculares até que a imagem visualizada fique unificada;
- Aumente gradativamente as objetivas ajustando o foco através do micrométrico caso necessário;
- Diminua a luz;
- Preencha o cabeçalho da ficha de análise com as informações presentes no frasco da amostra devidamente etiquetado. Aumente a luz e inicie a análise preenchendo a ficha;
- Atenção à redução da luminosidade do microscópio ao realizar qualquer procedimento que não exija a uso das oculares. Recomenda-se sua diminuição;
- Abaixar a luz, diminua a platina, volte para a objetiva de menor aumento ao analisar e percorrer toda a lâmina;
- Transfira a amostra analisada para um frasco de descarte. Coloque as lâminas e lamínula no molho de detergente e em béqueres separados e identificados;
- Para dar prosseguindo a análise, repita os passos de 4-12, com atenção ao passo 12;
- Ao final da análise, reduza a luz do microscópio, abaixe a platina, deixe a objetiva de menor aumento perpendicular à platina e desligue-o;
- Limpe as objetivas, oculares e platina com algodão e solução de limpeza de microscópio (Álcool, clorofórmio e éter) presente na geladeira;
- Cubra-o com sua capa protetora e guarde a ficha de análise na repartição de análise qualitativa na pasta do projeto RRDM;
- Preencha a ficha presente no caderno de controle de uso dos microscópios e atualize a planilha de cronograma;

- Guarde os materiais utilizados durante a análise em seus respectivos lugares.
- O béquer com água destilada e pipeta serão utilizados quando a lâmina secar, cuidado para a água destilada não cair na bancada e microscópio. A agulha deverá ser utilizada durante tentativas de promover mudanças de posição de um espécime através de leves batidas na lamínula. A adição de água a lâmina e leves batidas nas lamínulas deverão ser realizadas em objetivas de menor aumento.
- Nas fichas de análise poderão ser preenchidas informações específicas do ponto em análise caso necessário. Tais informações poderão auxiliar nas discussões dos relatórios mesmo que não requisitada nos campos de preenchimento da ficha.

- Amostras quantitativas

Será realizado um levantamento de todas as amostras quantitativas coletadas em campo. As amostras quantitativas coletadas em frascos de polietileno de 250 mL serão re-etiquetadas contendo informações referentes ao ponto onde foi coletada, enquanto as de frascos Nalgon de 1L serão submetidas às sedimentações, de modo a reduzir o volume e serem armazenadas em frascos de polietileno de 250mL para estocagem e armazenamento.

As recomendações procedimentais para redução do volume das amostras dos frascos Nalgon de 1L realizadas em laboratório é dada pelos passos:

- Anotar o volume total de amostra coletada (lembrar-se de descontar o volume do reagente 50mL);
- Deixar a amostra sedimentando em próprio frasco de coleta por aproximadamente 1 semana;
- Retirar o sobrenadante até 250mL de cada frasco de 1L e transferir para o frasco de 250mL (volume final). Utilizar pipeta graduada.
- Retirar o sobrenadante com pipeta e transferir a fração sedimentada para proveta de 100 ml, sedimentar por mais 5 dias;

Para análise quantitativa do material coletado será utilizado microscópio invertido equipado com câmera para registros de imagens e ocular de medição. As amostras serão sedimentadas por um período mínimo de 24 horas ou mais conforme o método proposto por Uthermöhl (1958), em cubeta de sedimentação de 25mL ou 50mL.

Como procedimento para a análise quantitativa em microscópio será recomendado que:

- Monte um cronograma de análise em um arquivo incluindo informações sobre os pontos amostrais. O nome do analista deverá ser informado ao início da análise;
- Atenção: Nesse ponto, podem ser estabelecidos caminhos de acordo com a procedência da amostra;

- Se proveniente de águas oligotróficas é recomendado retirar o sobrenadante do frasco de 250mL utilizando uma pipeta graduada e transferir a amostra para proveta de 100 mL, deixando sedimentar por mais 5 dias. Após, retirar novamente o sobrenadante e transferir a fração sedimentada para coluna de sedimentação de 50mL, sedimentar por 2 dias (tempo de sedimentação: 3 horas por centímetro de altura da coluna de sedimentação).
- Se necessário a diluição da amostra para distribuição adequada das partículas, é recomendado adicionar 10mL de amostra e 90mL de água destilada em uma proveta de 100mL. Homogeneizar e transferir para coluna de 25mL.
- Separe em bandeja uma amostra, câmara de contagem, lâmina redonda em acrílico, coluna de sedimentação apropriada (25mL ou 50mL), antes seguir passos 2.1 ou 2.2;
- Verifique se a lamínula da câmara está danificada. Caso necessário faça sua troca;
- Una perpendicularmente câmara a coluna através de glicerina depositada em sua base. Preencha o volume de amostra à coluna em uma única adição, evitando a formação de bolhas de ar. Cuidado para não romper a conexão câmara-coluna. O procedimento deve ser realizado na bandeja para evitar perda de amostra se rompido a conexão e pode ser feito diretamente do frasco 250mL ou utilizando pipeta;
- Tampe a coluna com a lâmina de acrílico redonda evitando a formação de bolha de ar;
- Indique em fita crepe informações sobre o código da amostra, ponto amostral, profundidade, data e campanha, e cole na base da câmara;
- Separe uma caixa organizadora formato retangular com tampa;
- Introduza isopor na base interna da caixa organizadora para seu nivelamento;
- Transfira, cuidadosamente, a câmara e coluna contendo amostra para a caixa;
- Adicione a caixa água destilada e sanitária para evitar a evaporação e proliferação fúngica;
- Feche e reserve a caixa na parte mais isolada da bancada do laboratório para evitar que a amostra vaze da coluna em função de esbarrões acidentais ou trepidações;
- Guarde todo material utilizado no processo de sedimentação da amostra;
- Anote em caderno de protocolo e planilha de cronograma o horário em que a amostra foi sedimentada;
- Aguarde 24 horas passadas do horário inicial da sedimentada;
- Verifique se não houve o vazamento da amostra após as 24 horas;
- Transfira cuidadosamente a amostra sedimentada para outra bandeja;
- Reserve uma lâmina quadrada e a posicione paralelamente a base da coluna de sedimentação;
- Empurre delicadamente a lâmina quadrada contra a base da coluna de modo a eliminar o sobrenadante e para evitar a formação de bolhas. A lâmina deverá cobrir toda a parte de inox da câmara;
- Transfira o conteúdo da coluna para o frasco inicial de onde se retirou a amostra, com cuidado para não se perder os 2 mL presentes na câmara com lâmina quadrada;
- Coloque a coluna no molho de detergente e água destilada;

- Retire com papel toalha o excesso de amostra proveniente da transferência para não umedecer o microscópio invertido e dirija-se a ele;
- Retire a capa protetora do microscópio;
- Coloque a câmara com lâmina, ligue-o, verifique se está no contraste de fase normal. Aumente gradativamente sua luz;
- Em objetiva de 40X mexa no macrométrico até encontrar algum “borrão”. Ajuste o foco com o micrométrico até ver a imagem limpa;
- Regule a distância entre as oculares até que a imagem visualizada fique unificada.
- Percorra a câmara para identificar as características da amostra em se tratando de material particulado;
- Diminua a luz;
- Preencha o cabeçalho da ficha de análise quantitativa com as informações presentes no frasco da amostra devidamente etiquetada;
- Separe a folha contendo os pontos aleatórios adequados a cada microscópio invertido. Nas coordenadas o primeiro número corresponde ao eixo X, régua horizontal presente na platina, e segundo Y, régua vertical;
- Aumente a luz;
- Inicie a análise preenchendo a ficha de análise quantitativa;
- Atenção à redução da luminosidade do microscópio ao realizar qualquer procedimento que não exija a uso da ocular. Recomenda-se sua diminuição para evitar a evaporação da amostra em análise, presença de bolhas na amostra indica evaporação;
- Abaixar a luz e desligue o microscópio para dar prosseguindo a análise com outra amostra. Transfira a amostra analisada para o frasco da amostra. Coloque câmara e lâmina no molho de detergente;
- Repita os passos 16 em diante exceto 21;
- Ao final da análise, reduza a luz do microscópio, desligue-o;
- Limpe as objetivas, oculares e platina com algodão e solução de limpeza de microscópio (Álcool, clorofórmio e éter) presente na geladeira;
- Cubra-o com sua capa protetora e guarde a ficha de análise na repartição de análise quantitativa na pasta do projeto RRDM;
- Preencha a ficha presente no caderno de controle de uso dos microscópios e atualize a planilha de cronograma;
- Guarde os materiais utilizados durante a análise em seus respectivos lugares;
- A contagem deverá ser realizada no aumento de 400 vezes. Registros fotográficos poderão ser realizados em aumento superior ou inferior, mas para contagem o aumento proposto pela literatura deverá ser respeitado. Poderá alterar o contraste na contagem para observação detalhada do espécime analisado.

Os organismos serão fotografados, esquematizados e contados por meio dos microscópios invertidos em aumento de 400 vezes, utilizando procedimento descrito por Uehlinger (1964), através do uso de campos aleatórios cujas coordenadas serão geradas no software Campare, que posteriormente serão colocados na platina do microscópio. Para cada contagem será gerado um sistema de campo aleatório diferente. O critério utilizado para determinação do número de campos a serem contados será o que procura alcançar 100 indivíduos da espécie mais abundante. De acordo com Lund et al. (1958), isto permite trabalhar com intervalos de confiança de $\pm 20\%$ da média, a um nível de significância de 95%, considerado suficientes para estudos dessa natureza.

- Tratamento dos dados

Os organismos serão classificados em duas frações de tamanho durante as contagens: nanofitoplâncton (2-19 μm) e microfitoplâncton (20-200 μm). Os espécimes encontrados terão as medições de suas dimensões retiradas e anotadas no caderno de registro morfométrico (medidas e formato) como subsídio para o cálculo do biovolume, seguindo as recomendações de literaturas como Hillebrand et al. (1999), Sun e Liu (2003), Olenina et al. (2006), Vadrucci et al. (2013) sobre a forma geométrica atribuída a cada grupo taxonômico.

Os resultados serão expressos em organismos por mL (densidade numérica de organismos), conforme Equação 4.

$$N = n \times \frac{A}{a} \times \frac{1}{V}$$

Equação 4

Onde:

N = Número de organismos por mL

n = número de organismos contados

a = Área contada

A = Área total da câmara

V = Volume total sedimentado

Os índices de diversidade específica (bits•organismo⁻¹) serão calculados a partir dos valores de densidade numérica do fitoplâncton, conforme o método proposto por Shannon e Weaver (1949) através da respectiva Equação 5:

$$H = - \sum_{i=1}^N p_i \times \log_2 p_i, \text{ sendo } p_i = \frac{n_i}{n}$$

Equação 5

Onde:

H: Diversidade específica da amostra;

ni: Número de indivíduos da espécie i;

N: Densidade total da amostra.

Os índices de equabilidade serão calculados através dos resultados obtidos com o índice de diversidade, e também o número de espécies encontradas nas amostras, de acordo com o que foi proposto por Pielou (1975, apud LEGENDRE & LEGENDRE, 1983). Seguindo a Equação 6 e Equação 7.

$$E = \frac{H}{H_{max}}$$

Equação 6

$$H_{max} = \log 2 \times S$$

Equação 7

Onde:

E = Equabilidade;

H = diversidade da amostra;

Hmax = diversidade máxima da amostra;

S = número de espécies da amostra.

Para os cálculos de diversidade e equabilidade será utilizado o programa estatístico Past.

Copie para a planilha de trabalho do programa os seus dados, onde as linhas serão os táxons encontrados na amostra quantitativa e nas colunas a densidade numérica dos táxons em cada estação amostral, ou pontos de coleta (se um táxon aparecer na estação amostral um e na dois não tiver representatividade numérica coloque o número zero ao invés de deixar em branco). Em seguida, selecione todos os dados da planilha, na barra de ferramentas vá em diversity -> diversity índices, o programa apresentará os resultados em tabela, onde cada estação terá uma coluna com o nome da estação (média da máxima e mínima), uma coluna com valor máximo e outra com o valor mínimo. Os valores de diversidade estarão na linha referente a Shannon_H e os de equabilidade na linha Equitability_J. Quando maior o valor de diversidade, maior será a diversidade ficoclorística. Já a equabilidade varia de 0-1, sendo 0 quando os táxons não estão igualmente representados numericamente, e 1 quando eles estão igualmente representados numericamente. Os valores médios de diversidade, importados do programa PAST 3.0, devem ser convertidos pela multiplicação por 1,44. O programa calcula a diversidade com log neperiano, enquanto que nos Projetos do LabFito utiliza-se log na base 2.

Os índices de abundância e dominância utilizam dos valores de densidade numérica da comunidade fitoplanctônica seguindo o proposto por Lobo & Leighton (1986), onde serão consideradas espécies dominantes aquelas onde que suas densidades superaram 50% da densidade total de suas respectivas amostras. E abundantes aquelas que possuírem densidade numérica superior ao valor médio da densidade total de indivíduos de cada amostra.

Procedimento para análise de pigmentos (clorofila-a, clorofila-b, clorofila-c, feopigmentos e carotenoides) em laboratório

Nessa secção é descrita os procedimentos para o método espectrofotométrico da análise de pigmentos e se subdivide em procedimentos de coleta e filtração, extração dos pigmentos e leitura das absorbâncias.

Serão utilizados álcool 70%, solução de acetona 90%, solução de ácido clorídrico 0,1N e carbonato de magnésio em etapas específicas:

Acetona 90%

Materiais:

1. 01 proveta de 2L;
2. 01 proveta de 1L;
3. 02 frascos de vidro âmbar de 1L;
4. 01 funil;
5. 1L de acetona 99,5%;
6. 105,56mL de água destilada;
7. Parafilme;
8. Capela.

As recomendações procedimentos são:

1. Medir 105,56mL de água destilada em proveta de 1L e reservar. Vedar com parafilme.
2. Adicionar 1L de acetona 99,5% em uma proveta de 2L e vedar com parafilme. O procedimento deverá ser realizado em capela;
3. Transferir 105,56mL de água destilada para a proveta de 2L contendo acetona com auxílio de um funil para obtenção da acetona 90%.
4. Passar acetona 90% para frasco de vidro âmbar e vedar a conexão da tampa e frasco com parafilme.
5. Identificar o conteúdo do frasco com nome da solução, concentração, data de preparo, nome de quem preparou e armazenar em geladeira.

Álcool 70%

Materiais:

1. 01 proveta de 2L;

2. 01 proveta de 1L;
3. 01 funil;
4. 1L de álcool 99,5%;
5. 421,43 mL de água destilada;
6. 02 frascos de 1L
7. Parafilme;
8. Capela.

Para obtenção de álcool 70% recomenda-se:

1. Medir 421,43mL de água destilada em proveta de 1L e reservar;
2. Adicionar 1L de álcool 99,5% em uma proveta de 2L e vedar com parafilme. O procedimento deverá ser realizado em capela;
3. Transferir 421,43mL de água destilada para a proveta de 2L contendo álcool com auxílio de um funil para obtenção do álcool 70% e em seguida transferir para frascos de 1L;
4. Identificar o conteúdo do frasco com nome da solução, concentração, data de preparo, nome de quem preparou e armazenar em ambiente refrigerado.

Solução de ácido clorídrico 0,1N

Materiais:

1. 8,5 ml HCl concentrado;
2. 1000 ml de água destilada;

Para obtenção da solução de ácido clorídrico 0,1N:

1. Colocar 500 ml água destilada em um balão volumétrico de 1L;
2. Adicionar os 8,5 ml de HCl concentrado e esperar arrefecer;
3. Completar para 1L com o restante da água destilada;
4. Armazenar em frasco escuro vedado;

Solução saturada de carbonato de magnésio 1%

Materiais:

1. 01 grama de Carbonato de Magnésio ($MgCO_3$);
2. 100mL de água destilada;
3. 01 Béquer de 100mL
4. 01 Erlenmeyer de 250mL;
5. 01 Balança de precisão;
6. 01 Frasco de vidro âmbar de 500mL.

Procedimento:

1. Pesar 1g de Carbonato de Magnésio em um béquer;
2. Transferir para o Erlenmeyer e adicionar a água;
3. Homogeneizar a solução e esperar precipitar;

4. Retirar o sobrenadante. (Caso tenha sobrado uma quantidade muito grande de precipitado pode-se adicionar mais água e repetir a etapa 3 para aproveitar o máximo de reagente possível, até sobrar pouco Carbonato de Magnésio precipitado);
5. Transferir o sobrenadante para o frasco âmbar etiquetado (nome da solução, concentração, data de preparo da solução e nome de quem preparou).

- Extração dos pigmentos

Os materiais necessários na etapa de extração dos pigmentos fotossintéticos realizados em laboratório são:

- Tubos Falcon de 15 mL identificados na tampa (246 nas semestrais, 204 nas trimestrais e 66 nas mensais) devidamente limpos, secos, isentos de vestígios de ácidos e com tampas;
- Filtros com células armazenados em recipiente com sílica gel.
- Capas de papel alumínio envolvido em fita crepe para os tubos Falcon. Identificar as capas;
- 01 Pinça de metal de ponta lisa e chata, limpa com álcool 70%;
- 01 Frasco com acetona 90% (Protocolo no “Caderno de Protocolo RRDM” e Dropbox);
- 01 Pisseta com água destilada;
- 01 Pisseta com álcool 70%;
- 01 Pipeta de vidro graduada (volume: 10 mL), devidamente limpa;
- Mixadores eletrônicos (chechar as pilhas);
- Grades para colocar tubos Falcon;
- 01 Refrigerador com temperatura a 4°C;
- 01 Béquer para descarte de resíduos;
- 01 Planilha para anotação de informações extras, volumes filtrados e absorbâncias.

Durante o procedimento de extração dos pigmentos fotossintéticos serão utilizados jalecos, sapatos fechados, máscaras para vapores orgânicos e luvas descartáveis, e como procedimento analítico recomenda-se:

1. Anotar em planilha a hora inicial e final (após mixagem) desta etapa.
2. Descongelar as amostras contidas em recipiente de sílica gel em temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Em local escuro ou penumbra e bem ventilado, utilizar pinça metálica (limpa com álcool 70%) para colocar cada filtro num tubo Falcon estéril com tampa (para evitar volatilização do solvente), com capa e identificado.

4. Pipetar 5mL de acetona 90% em cada tubo Falcon sem que a pipeta encoste no filtro;
5. Mixar as amostras através do uso de mixador por 1 minuto ou até que o filtro se dissolva na acetona 90%.
6. Pipetar mais 5mL de acetona 90% em cada tubo Falcon, resultando em 10mL.
7. Colocar os tubos nas grades e armazená-los no refrigerador/geladeira a um temperatura de +4°C, ao abrigo da luz, por um período entre 20 a 24 horas (deixa-se amostra em *overnight*)

Algumas horas antes de completar o período de 24 horas da extração a frio, recomenda-se agitar levemente os tubos Falcon para auxiliar a extração.

- Leitura das absorvâncias

Para o procedimento de leitura das absorvâncias em espectrofotômetro, realizado 24 horas após a extração a frio, serão utilizados:

- 08 Cubetas de quartzo com tampas (Cubetas de vidro ótico com tampa G-4);
- Tubos Falcon de 15mL devidamente encapados e contendo amostras mixadas em acetona 90% (quantidade dependerá da quantidade de frascos/réplicas);
- Capas para envolver tubos Falcon;
- 01 Caixa com lenço de papel;
- 01 Pinça de metal de ponta lisa;
- 01 Frasco com acetona 90%;
- 01 Frasco com HCl (volume usado: 100 µL = 0,1 mL);
- 01 Pisseta com água destilada;
- 01 Pisseta com álcool 70%;
- 02 Grades para colocar tubos Falcon;
- 01 Cronômetro;
- 01 Centrífuga (EXCELSA I 2206 FANEN – 16 posições);
- 01 Espectrofotômetro (T80 PG INSTRUMENTS);
- 01 Planilha para anotação de informações extras, volumes filtrados e absorvâncias;

A leitura deverá ser realizada, de preferência, por 2 pessoas para agilizar a análise e evitar maior tempo de exposição a erros através das recomendações:

1. Retirar 16 tubos Falcon do refrigerador e centrifugar o conteúdo dos mesmos por 5 minutos a 5.000 rpm. Em seguida, transferir o sobrenadante para outro tubo Falcon e repetir o processo de centrifugação. A centrifugação será de 16 em 16 amostras – colocando-as em opostos para equilibrar o peso.

Atenção: Os restantes das amostras permanecem no refrigerador até que o início da leitura da ABS da penúltima amostra em espectrofotômetro, visto que apenas 16 amostras podem ser centrifugadas e o tempo de leitura do conjunto de amostras varia em torno de 10 minutos.

2. Ligar o espectrofotômetro (T80 PG INSTRUMENTS) e aguardar cerca de 3 minutos até que ele inicie completamente, quando o menu inicial aparecer no LDC. Caso não inicie verifique se há alguma amostra dentro do equipamento. A análise em espectrofotômetro deverá ocorrer em local escuro ou penumbra.

3. Aguardar entre 15-30 minutos para que as lâmpadas do espectrofotômetro aqueçam para que os dados sejam precisos e estáveis;

4. As 08 cubetas de quartzo com 08 tampas devem ser ambientadas com acetona 90% antes da introdução da amostra;

5. No espectrofotômetro, uma solução de referência (acetona 90%) deverá ser usada para zerar a leitura do equipamento. A acetona 90% (branco) deverá ser homogeneizada e vertida na cubeta de quartzo, que deverá ser colocada na primeira posição dentro do espectrofotômetro;

6. Em seguida, cubetas contendo as amostras para análise devem ser introduzidas nas demais posições do espectrofotômetro. Atenção ao possível vazamento da amostra umedecendo a parede externa da cubeta quando introduzida no espectrofotômetro e ao controle da identificação das amostras.

7. Verificar se espectrofotômetro está configurado para leitura das absorvâncias. Digitar o comprimento de onda desejado para a leitura das absorvâncias (480, 510, 630, 647, 665 ou 750 nm)*.

Atenção: Ao pegar amostra do tubo Falcon deve-se tomar cuidado para não ressuspender os resíduos de filtro que se encontram sedimentados no fundo, caso contrário deverá ser repetido o procedimento de centrifugação da amostra.

8. (Sem acidificação): Realizar a leitura e anotar a absorvância (ABS) primeiro no comprimento de onda de 480 nm, em seguida 510, 630, 647, 665 nm e 750 nm. A leitura deve ser imediata após a estabilização da ABS, que aparece automaticamente na tela do espectrofotômetro. Além disso, a cada mudança de λ deve-se zerar a leitura com acetona 90%.

9. (com acidificação): Após a leitura da ABS no λ de 750 nm, efetuar a fase de acidificação (conversão da clorofila em feopigmentos), retirando a cubeta com extrato do espectrofotômetro e acrescentando 100 μ L (0,1 mL ou 2 gotas pipetadas) de HCL (0,2 M) no mesmo. Aguardar 2 minutos, efetuando agitação da cubeta por 1 minuto.

10. (com acidificação): Realizar a leitura imediata do extrato acidificado e anotar a absorvância (ABS) no comprimento de onda de 750 nm, seguido do λ de 480 nm.

11. Descartar a amostra e efetuar a lavagem da cubeta com água destilada (3 vezes) seguida de 1 mL de acetona 90%. Secá-la com papel macio (Ex.: lenço de papel) para não arranhar a mesma, principalmente as paredes não opacas (transparentes), que devem ser secas e limpas para não atrapalhar a passagem do feixe de luz. Retirar o excesso de água de dentro da cubeta ao bater levemente a cubeta de cabeça para baixo em um papel.

12. Realizar a leitura das absorbâncias de novo extrato repetindo-se as etapas anteriores, lembrando que extrato deverá ser lido em DUPLICATA e que a cada mudança de comprimento de onda deve-se zerar a leitura do espectrofotômetro com acetona 90%.

Atenção: O procedimento de leitura deverá ser feito em menor tempo possível para evitar evaporação da acetona e conseqüentemente a variação do volume do extrato na cubeta.

1) As instruções de uso dos espectrofotômetros variam conforme o modelo. Há a possibilidade de colocar a leitura em multicomprimentos, onde previamente colocam-se todos os comprimentos de onda e o aparelho lê cada cubeta em cada comprimento automaticamente, apresentando os valores ao final da análise.

2) As faces opacas da cubeta deverão estar em contato com as paredes do local de encaixe, para que não ocorra impedimento da luz pelo líquido.

3) As ABS, antes e após acidificação, o volume de amostra filtrada e o volume de acetona 90% utilizado na extração serão usados no cálculo para determinar as concentrações de clorofila-a, clorofila-b, clorofila-c, feopigmentos e carotenóides em µg/L (microgramas por litro).

A determinação espectrofotométrica da concentração de pigmentos fotossintéticos será obtida através das duas equações monocromáticas de Lorenzen (1967). Além disso, a clorofila-a ativa (%) será estimada a partir da razão dos valores de clorofila-a pela concentração total de pigmentos (clorofila-a e feopigmentos).

b) Ictioplâncton

Todas as análises serão realizadas no Laboratório de Ictioplâncton do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os ovos de peixes serão contados e triados, sob microscópio estereoscópico. As amostras com uma grande quantidade de ovos serão subamostradas com fracionador de Folsom (McEwen et al., 1954). A contagem e triagem das larvas de peixes serão realizadas na totalidade da amostra. Para a análise quantitativa será calculada a densidade dos ovos e larvas extrapolados para um volume padrão (100 m⁻³). A identificação dos ovos e larvas de peixes será realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, utilizando alguns parâmetros merísticos e morfométricos.

As larvas serão medidas, para auxiliar na identificação, com ocular e lâmina milimetrada de 0,1 mm de precisão. Para medida do tamanho do corpo será utilizado o comprimento padrão (CP). A identificação será realizada com auxílio de referências bibliográficas especializadas, tais como: Richards (2006); Bonecker e Castro (2006); Fahay (2007), Bonecker et al. (2014), entre outros.

A terminologia adotada para os diferentes estádios de desenvolvimento das larvas de peixes seguirá a proposta por Moser (1996): larvas vitelínicas, pré-flexão, flexão e pós-flexão.

O inventário de larvas de peixes será baseado na classificação de Nelson et al. (2016). Todos os nomes de famílias e espécies de peixes identificadas no presente estudo serão checados e atualizados seguindo Eschmeyer et al. (2019). Após a identificação todos os ovos e larvas serão tombados na coleção de ictioplâncton do Laboratório Integrado de Zooplâncton e Ictioplâncton da Universidade Federal do Rio de Janeiro – DZUFRJ.

Para auxiliar na interpretação dos resultados serão confeccionados tabelas e gráficos, além da entrada dos dados no banco de dados Laboratório Integrado de Zooplâncton e Ictioplâncton da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Serão realizados testes estatísticos e análises multivariadas para auxiliar na interpretação dos resultados da assembleia das larvas de peixes.

c) Zooplâncton

Equipamentos e materiais necessários:

- Microscópio binocular Nikon Eclipse 50i e Olympus CX41, com ocular de aumento 10x e objetivas com aumento de 4, 10, 25 e 40x;
- Microscópio estereoscópico (lupa) Nikon SMZ800 e Zeiss Stemi 2000 com ocular de 10 e 20x e objetivas em “zoom”;
- Peneira de malha de 60 μ m;
- Câmaras de Bogorov, com capacidade de 35 ml;
- Lâmina lisa;
- Pipeta de Pasteur;
- Fracionador de Folsom “Folsom Plankton Sample Splitter”;
- Pinças de ponta fina;
- Contador manual;
- Agulha 0,15 mm (Insect pins);
- Pisseta;
- Béquer graduado;
- Filtros de náilon com abertura de malha de 60 μ m;
- Bomba a vácuo;

- Dessecador;
- Balança de precisão;
- Estufa.

Identificação morfológica e quantificação (análise quali-quantitativa)

- Com o auxílio de uma peneira de tela de nylon, com abertura de malha de 60 µm, retirar o formaldeído da amostra e transferir os organismos para um béquer com água. Guardar o formol original da amostra.
- Transferir os organismos para o subamostrador Folsom e subdividir a amostra até a obtenção de 500 indivíduos.
- Certificar-se de que o subamostrador Folsom foi bem limpo entre as frações, com o auxílio de pisseta e jatos de água.
- Transferir a subamostra para uma placa de Bogorov. Em estereomicroscópio analisar e identificar os organismos até o menor nível taxonômico possível, utilizando bibliografia especializada.
- Para identificação de alguns organismos será necessário dissecá-los com agulhas (insects pins) de 0,15 mm em esteromicroscópio, para observação em microscópio comum.
- O restante da amostra que não foi utilizada para identificação deve retornar ao formol original da amostra.
- 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.

- Biomassa

Peso úmido:

- Os filtros de malha de nylon de 160 µm devem ser mantidos secos antes de serem pré-pesados em balança com precisão de 0,1 mg.
- A amostra deve passar através do filtro de malha de nylon, com a ajuda de um funil de vidro.
- A amostra acumulada na malha de nylon deve ser colocada no dessecador. Com o auxílio de uma bomba será gerado vacuo dentro do dessecador e assim as amostras devem permanecer pelo tempo necessário para a eliminação do excesso de água. O tempo exato em que cada amostra ficará dentro do dessecador será avaliado no momento, dependendo das condições da amostra.
- A amostra será pesada em uma balança de precisão e o peso úmido calculado de acordo com a fórmula:
 - $\text{Peso úmido (mg.m}^{-3}\text{)} = \text{amostra úmida no filtro (mg)} - \text{filtro (mg)}/\text{volume filtrado (m}^{-3}\text{)}$
- *Peso seco:*
 - A amostra será acondicionada em cadinho de porcelana de 30 ml com tampa. A secagem da amostra na estufa deve ser feita a 60 °C por 24 horas (Lovegrove, 1962) para evitar a perda de materiais orgânicos mais voláteis como lipídeos. Para organismos gelatinosos e crustáceos maiores, como Brachyura, é indicado uma temperatura de 140 °C (Madin *et al*, 1981).

- A concentração do peso seco é calculada segundo a fórmula:
- $\text{Peso seco (mg.m}^{-3}\text{)} = \text{amostra seca no filtro (mg)} - \text{filtro (mg)} / \text{volume filtrado (m}^{-3}\text{)}$

d) Bentos marinho de substrato inconsolidado

Processamento das Amostras

Após a coleta de fundo inconsolidado na Plataforma Continental ao longo dos pontos amostrais estabelecidos no Projeto RRDM, as amostras serão levadas do barco para a Base Oceanográfica da UFES em Santa Cruz, Aracruz, ES, onde serão submetidas ao processo de lavagem, conforme se segue.

- Materiais necessários para a lavagem:
 - recipientes para medir volume das amostras (béquer ou proveta graduados);
 - peneiras de granulometria de 2 mm e 0,5 mm;
 - 1 ou 2 baldes para recebimento da amostra peneirada – conforme descrito abaixo;
 - espátula para manipulação da amostra;
 - 3 potes para acondicionamento das amostras retidas nas peneiras – 1 para cada alíquota de uma mesma amostra;
 - etiquetas em papel vegetal – uma para cada pote, com o respectivo número da alíquota;
 - canetas marcadoras para anotar o nome das amostras na parte externa nos potes;
 - caderno para anotação das amostras processadas;
 - lápis para anotação no caderno;
 - jaleco;
 - luvas;
 - óculos de proteção.

Procedimento:

- Retirar uma das amostras da bombona;
- Transferir o conteúdo para um recipiente graduado;
- Medir o volume total de amostra (sedimento) e anotar em caderno;
- Separar o volume total em 3 alíquotas de igual volume e anotar em caderno;

- Transferir cada uma das alíquotas para as peneiras de granulometria de 2 mm e 0,5 mm de malhas, aos poucos para não transbordar o volume das peneiras e não perder material. Observações: a peneira de 2 mm deverá estar posicionada sobre a peneira de 0,5 mm e ambas dentro de um balde para evitar perda de material, posicionado dentro do tanque de lavagem das amostras ou a peneira de 2 mm deverá estar posicionada dentro de um balde e a peneira de 0,5 mm deverá estar posicionada dentro de um segundo balde separadamente. O material passado pela peneira de 2 mm e recolhido no primeiro balde deverá ser passado pela peneira de 0,5 mm de malha, posicionada no segundo balde. Estas opções poderão ser definidas de acordo com o volume de amostra e natureza do sedimento (arenoso ou lamoso). Em todas as situações, o material retido nas malhas de 2 mm e 0,5mm serão acondicionados no mesmo recipiente, devidamente etiquetado com as informações da amostra e alíquota correspondente.
- Lavar a amostra na peneira com água doce corrente dentro do balde, fazendo movimentos circulares delicados dentro da peneira, com espátula macia ou com as mãos, para não danificar a macrofauna;
- As amostras de cada alíquota retidas nas peneiras de 2 mm a 0,5 mm serão colocadas em um único pote, devidamente etiquetados;
- As etiquetas em papel vegetal deverão ser colocadas no interior dos recipientes de plástico e no lado de fora deverá ser anotado apenas o código (nome/ localidade) da amostra e alíquota correspondente.

Após a lavagem, o material a ser triado será distribuído entre os três laboratórios envolvidos no projeto, a saber: Laboratório de Malacologia (Responsável: Dra. Mercia B. Costa) – Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Goiabeiras, Vitória, ES; Laboratório de Zoologia (Responsável: Dra. Adriane A. Braga) – Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, Alegre, ES; Laboratório de Organismos Marinhos Bentônicos (Responsável: Dra. Leila de L. Longo) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. Nestes laboratórios, as equipes procederão à triagem dos organismos, considerando o menor nível taxonômico possível. Os organismos para os quais não for possível a identificação, serão encaminhados a outros especialistas. A metodologia envolvida nesta etapa é apresentada a seguir.

- Triagem do material em laboratório

Ao final da lavagem, para cada amostra teremos 3 alíquotas, sendo 1 pote para cada alíquota, conforme o seu volume original (total = 3). Inicialmente deve-se determinar a amostra a ser trabalhada com suas 3 alíquotas e fazer a separação do material como descrito a seguir.

- 1 pote de 100 ml a ser triado para cada alíquota (total = 3);
- 1 pote de 100 ml para acondicionar o que já foi triado de cada alíquota chamado de “resto” (total = 3);

- 1 pote para acondicionar o que eventualmente sobrar na placa de Petri, que não foi possível terminar no dia, chamado de “triando” – 1 para cada alíquota (total = 3).
- diversos potes (~10 ml) para acondicionamento dos organismos triados por alíquota;
- bandejas para organização do material;
- material de dissecação: pinças de ponta fina (relojoeiro), pinças macias, pincéis macios, estiletes, espátulas, pipetadores;
- recipiente de 100 ml (becker ou proveta) para medir o volume das amostras a serem triadas;
- proveta de 1l para diluição do álcool;
- 2 picetas de 300 ml: uma para álcool e outra para água;
- placas de Petri;
- caneta de retroprojektor ponta fina e ponta grossa;
- papel toalha;
- álcool diluído 70%;
- funil pequeno (~10 cm de diâmetro de boca);
- etiquetas de papel vegetal para os frascos com material triado (organismos).

Procedimento sobre bancada com pia:

- Preparar a diluição do álcool a 70% - assegurar o volume necessário para o trabalho de cada dia, pelo menos;
- Medir os 100 ml de cada alíquota que serão triados em recipiente específico e acondicionar nos respectivos potes, devidamente etiquetados com papel vegetal dentro e o código da amostra escrito por fora do frasco – isto poderá ser feito a cada alíquota trabalhada;
- Determinar uma alíquota e separar um volume (~30 ml) de amostra para ser trabalhado no dia – este volume irá variar conforme a prática de triagem do pesquisador, natureza do sedimento e quantidade de organismos na amostra;
- Transferir o volume a ser triado no dia para uma Placa de Petri com tampa;

Obs.: Até este momento cada amostra terá:

- 1 pote original para cada alíquota (total = 3);
- 1 pote de 100 ml a ser triado para cada alíquota (total = 3);
- 1 pote para acondicionar o que já foi triado de cada alíquota chamado de “resto” (total = 3);

- 1 pote para acondicionar o que eventualmente sobrar na placa de Petri, que não foi possível terminar no dia, chamado de “triando” – 1 para cada alíquota (total = 3);
- potes para separar os organismos triados por grandes grupos taxonômicos, por alíquota.
- Caso prefira, o fundo da placa de Petri poderá ser dividido em quadrantes numerados (utilizando a caneta de retroprojeto) para orientar os campos de triagem na lupa – fazer esta divisão antes de colocar a amostra.

Procedimento sobre a bancada de equipamentos ópticos

- Levar para próximo do equipamento óptico (lupa), usando uma bandeja de organização:
 - a placa de Petri - garantir que seu fundo esteja seco;
 - potes pequenos para organização (separação) do material triado;
 - caneta de retroprojeto para escrever nos potes;
 - material de dissecação – pinças de relojoeiro, pinças macias, pincéis, espátulas, estiletes e pipetadores de plásticos para manipulação dos organismos;
 - etiquetas de papel vegetal;
 - papel toalha.
- Organizar o espaço de trabalho junto ao equipamento óptico (lupa) de forma a estar limpo, seco e livre para movimentação dos seus braços – colocar os potes distantes o suficiente para não entorná-los;
- Iniciar retirando da amostra (na placa de Petri) os organismos maiores, separando em seus respectivos potes devidamente identificados com a caneta de retroprojeto – neste momento inicial faça a triagem de um grupo por vez dos maiores, evitando ter diversos potes abertos ao mesmo tempo para não colocar amostras em potes trocados – este procedimento deverá ser adotado no decorrer da triagem, tendo sempre muita atenção às etiquetas dos potes;
- Anotar em cadernos colocados ao lado do equipamento óptico as quantidades de organismos de cada grupo – utilizar “riscos” para cada indivíduo, formando quadradinhos = , fazendo a contagem ao final do dia ou da triagem de cada amostra;
- Triar todo o material até restar apenas sedimento;
- Importante: Embora tenhamos prazos a cumprir, o detalhamento da triagem dos organismos é fundamental, de forma que este procedimento deva ser conduzido com a calma e precisão científica suficientes para que possamos garantir a confiabilidade dos dados gerados para as futuras publicações, mais do que volume de resultados em curto espaço de tempo.

- Devolver o restante da placa, após a triagem – o sedimento - no pote “resto”;
 - Obs.: Se necessário, voltar ao conteúdo do pote “resto” para certificar o detalhamento da triagem.
 - Voltar ao pote “triando” e retirar novo volume para triagem;
 - Repetir os passos de 7 a 13 até finalizar o dia de trabalho ou a amostra;
 - Preencher os potes pequenos com álcool 70% até cobrir o material - isto deve ocorrer ao final do dia de triagem;
 - Se certificar que nos potes pequenos com organismos separados, além de escrever na tampa e na lateral do pote o código da amostra, alíquota e o grupo taxonômico, colocar etiqueta de papel vegetal dentro do pote;
 - Guardar os potes com os organismos separados por ponto de amostragem dentro de caixas organizadoras pequenas por grupos taxonômicos, já visando o envio aos especialistas para identificação;
 - Assegurar que seus locais de trabalho – bancadas com pias, bancadas com equipamento óptico, mesa de trabalho, armários – estejam sempre limpos, secos e organizados.
 - Transferir ao final do dia os dados de quantidades dos grupos triados para a planilha excel de amostras, salvando sempre com a data da última atualização no nome do arquivo.
- Análise dos dados

A partir dos dados obtidos serão determinados: - a riqueza S da comunidade, diversidade de Shannon-Wiener, e a Dominância de Simpson, para a descrição da estrutura de comunidade de cada ponto amostral. O grau de similaridade entre os pontos amostrais, quanto aos componentes e bióticos e suas abundâncias, serão determinados por meio de análises de classificação. Dados abióticos como granulometria e contaminação por metais, gerados pelos grupos de pesquisadores de sedimentologia e química para cada ponto amostral, serão combinados aos dados abióticos aqui produzidos por meio de análises de ordenação, de forma que a ocorrência dos grupos taxonômicos identificados e suas abundâncias serão mapeadas nos diferentes ambientes geomorfológicos e profundidades da plataforma continental, ao longo do período de amostragem.

e) Fundos recifais, rodolitos e macroalgas

- Caracterização das comunidades de bancos de rodolitos

Para determinar a estrutura dos bancos de rodolitos serão usados quadros estáticos extraídos das filmagens (fotoquadrado) com uso de dropcamera. Serão analisados parâmetros de percentual de cobertura, densidade, vitalidade, forma e fauna e flora associada. Os parâmetros quantitativos serão analisados através da plataforma CoralNet (<https://coralnet.ucsd.edu/>), a qual permite automatizar

classificações (=identificação dos organismos) com diferentes níveis de supervisão. O sistema utiliza um algoritmo de “machine learning” que reconhece padrões de cor e textura das imagens (Beijbom et al. 2015). Serão obtidas 5imagens por sítio amostral, e cada imagem será processada usando 50 pontos aleatoriamente distribuídos. Parâmetros qualitativos serão analisados a partir do material coletado.

- Vitalidade e forma

A vitalidade dos rodolitos também será estimada a partir dos fotoquadrados. Será considerado rodolito vivo aquele cuja alga coralinácea formadora apresente pigmentação (i.e., talo róseo, vináceo, avermelhado ou com cores próximas). Serão considerados mortos os rodolitos que não apresentarem tal coloração ou que estejam com a superfície de esqueleto carbonático aparente, esbranquiçada. A partir desta metodologia, adaptada de Bahia et al. (2010) será calculado o percentual de cobertura de alga coralinácea viva em cada estação amostral.

O grau de esfericidade será utilizado para determinar a forma do rodolito, segundo Bosence & Pedley (1982) e Perry (2005), com base em medições dos diâmetros mínimo, intermediário e máximo de cada rodolito. Esses dados serão inseridos no programa Tri-plot v1.3 (Graham & Midgley 2000), o qual qualifica as formas em esférica, discóide ou elipsoide, com a fórmula: $(S^2/LI)^{1/3}$, onde:

S equivale ao menor diâmetro do rodolito,

I equivale à sua medida intermediária e,

L representa sua superfície maior.

Os resultados serão expressos em valores percentuais de cada forma por estação amostral, e também graficamente através do diagrama triangular gerado pelo programa.

- Fauna associada

Para a análise qualitativa, os organismos presentes na superfície de cada um dos 30 rodolitos coletados por estação amostral serão separados com pinças e alicates de corte diagonal, fotografados e identificados no nível taxonômico mais específico possível, a partir da visualização de caracteres morfoanatômicos sob microscópios estereoscópico e óptico com câmeras acopladas (Olympus SZX7 e BX 43), bem como com uso de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Zeiss (Evo 40). Adicionalmente, será analisada a composição dos organismos incrustantes no interior dos rodolitos. Para isso, rodolitos selecionados serão seccionados longitudinalmente em seu maior eixo, com o auxílio de retífica (MAKITA) e/ou microrretífica (Dremel 3000). Após a secção, os rodolitos serão lavados em água corrente e secos em estufa. A análise da estrutura interna e dos grupos de organismos que compõem cada amostra será realizada sob microscópio estereoscópico e lupa de mão. As imagens serão capturadas com o software Scope Image Dynamic Pro. Os principais grupos de organismos (e.g. algas coralináceas, briozoários, corais, foraminíferos e serpulídeos), inclusive bioerosores, serão identificados com base em características morfológicas e estruturais,

com base em Flügel (2009). Quando necessário, amostras específicas serão enviadas a especialistas. A quantificação dos grandes grupos associados aos rodólitos será realizada através dos métodos descritos para as análises de fotoquadrados. A porcentagem de cobertura dos diferentes organismos bentônicos será avaliada quanto à variação espaço-temporal com análises de variância (ANOVA) ou outras ferramentas estatísticas uni e multivariadas.

- Identificação taxonômica de macroalgas

As macroalgas coletadas serão triadas na Base Oceanográfica da UFES com base na morfologia externa (cor, comprimento, consistência, forma de fixação e tipo de ramificação). As amostras serão acondicionadas em recipientes plásticos com formol 4% e transportadas para o Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde serão lavadas e dispostas em bandejas com água do mar. Para o estudo das estruturas vegetativas e reprodutivas será feita a dissociação do material com auxílio de estiletos e/ou cortes anatômicos com lâminas de aço para observação microscópica. As macroalgas serão identificadas com base em Wynne (2011) e Guiry & Guiry (2019) e outros artigos científicos, dissertações e teses (e.g. Nassar et al. 1989; Littler & Littler 2000, Barata 2004; Brasileiro et al. 2015, Guimarães et al. 2016). Exemplares testemunho serão depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

- Identificação taxonômica das algas coralináceas (calcárias) incrustantes

No laboratório, as algas coralináceas incrustantes (ACI) serão fotografadas e separadas em morfótipos, de acordo com sua forma de crescimento (Woelkerling et al. 1993), tipos de estruturas reprodutivas (conceptáculos uniporados, multiporados ou soros) e variações morfológicas (e.g., elevado, plano, afundado, dimensões). Em exemplares selecionados serão combinadas três técnicas de identificação: análises de sequências de DNA, cortes histológicos (microscopia óptica) e fragmentos (MEV).

A extração de DNA seguirá o protocolo de Broom et al. (2008). O marcador plastidial (psbA), um dos principais marcadores para identificação molecular de ACI, será amplificado com os primers psbAF1 e psbAR2 (Yoon et al. 2002), conforme Saunders (2005). As sequências serão editadas no programa Geneious 11.15 e comparadas com aquelas de espécimes-tipo disponíveis no GenBank, com auxílio da ferramenta BLAST. O sequenciamento será realizado comercialmente por empresa contratada, e as sequências serão depositadas no GenBank.

A metodologia para os cortes histológicos será adaptada da técnica de Maneveldt & van der Merwe (2012), como segue:

1º Análise da amostra armazenada em sílica gel sob estereomicroscópio, visando selecionar o fragmento com mais estruturas reprodutivas (conceptáculos ou soros).

2º Descalcificação em ácido nítrico 10% até o desprendimento das bolhas de CO₂ liberadas durante a reação com o CaCO₃.

3º Desidratação em série crescente de etanol (70, 90 e 100%) por pelo menos 40 min. em cada concentração. Durante o intervalo entre as séries de 70 e 90%, limpeza da amostra com pinça e pincel para remoção de resquícios do substrato e materiais que possam danificar o corte (e.g., grãos de areia e outros fragmentos).

4º Secagem da amostra em papel toalha por 10 segundos para retirar o excesso de etanol e evitar a diluição da solução de infiltração.

5º Imersão da amostra em solução de infiltração (50ml de 2-hidroxietil metacrilato acrescido de 0,5 g de peróxido de benzoila; kit Leica Historessin) e manutenção em geladeira por pelo menos 12 h.

6º Polimerização: colocação e posicionamento da amostra em fôrma de silicone, considerando a orientação desejada para o corte e adicionando solução de inclusão (1,5 ml de solução de infiltração acrescida de 0,1 ml do agente polimerizante dimetilsulfóxido) até completo recobrimento. Manutenção da fôrma em estufa a 50-60°C por 20-30 min., ou até a polimerização completa.

7º Colocação do bloco de historessina em pote plástico vedado contendo sílica gel, por pelo menos 12 h, para remoção da umidade.

8º Execução de cortes transversais ou longitudinais de 5-9 μm com navalha de aço (Leica fio C), usando micrótomo rotatório (Jung),

9º Coloração por 2-3 min. com azul de toluidina O (C.I. 52040) (0,01 g do corante e 0,03 g de borato de sódio decaidratado diluído em 10 ml de água destilada).

10º Retirada do excesso de corante em banho de água destilada (2 min.).

11º Adição de gotas de água destilada em uma lâmina histológica e distensão dos cortes na lâmina com pincel e estilete.

12º Montagem de lâminas permanentes adicionando gotas de Entellan (Merck) na lâmina e cobrindo-a com lamínula.

13º Observação das características de interesse em microscópio óptico de campo claro com câmera de captura e auxílio do software Scopelimage DynamicPro.

A metodologia utilizada para as análises em MEV seguirá Bahia (2010), como segue:

1- Lavagem do material fixado em água corrente, para retirada do formol.

2- Secagem em estufa a 50 °C por 24 h.

3- Fratura da alga com alicate ou lâmina de aço visando obter secções transversais e superficiais da região de interesse do talo.

4- Posicionamento dos fragmentos em porta-espécime de alumínio (stub) com fita adesiva dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences).

5- Metalização do stub com ouro (20 nm) em metalizador Emitech K550X.

6- Observação ao MEV com aceleração de voltagem de 15 kV.

Os espécimes serão identificados com base em Woelkerling (1988), Harvey & Woelkerling (2007), Bahia (2014) e Van der Merwe (2015), bem como através de comparações com espécimes tipo disponíveis em herbários. Exemplares testemunho serão depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

- Abundância de macroalgas e organismos bentônicos na área litorânea

O percentual de cobertura dos principais grupos bentônicos amostrados na área litorânea da APA Costa das Algas e RVS Santa Cruz será estimado com base em imagens adquiridas em fotoquadrados e processadas com uso plataforma CoralNet, descrita acima. Em cada estação serão dispostos, aleatoriamente, 10 fotoquadrados, cada um composto por um mosaico de 15 fotos contíguas totalizando 0,7 m². Para estimativa do percentual de cobertura de cada táxon ou categoria serão empregados 15 pontos distribuídos aleatoriamente sobre cada imagem (225 pontos por quadrado), conforme Francini-Filho et al. (2013). As macroalgas abaixo de cada ponto serão identificadas no menor nível taxonômico possível e os demais organismos serão identificados em grandes grupos (e.g. coral, esponja, zoantídeo, ACI, algas calcárias articuladas, tufo).

A comunidade de macroalgas será categorizada através de estimativas de riqueza (S) e índices de diversidade, cuja similaridade será determinada pelo índice de Kulczynski ou análogos. As porcentagens de cobertura serão avaliadas quanto à variação espaço-temporal através de análises de variância (ANOVA) ou outras ferramentas estatísticas uni e multivariadas.

Caracterização da comunidade presente nas CAUs e medições COM dataloggers associados

- Procedimento pós-retirada das CAUs

As CAUs serão removidas dos locais onde foram instaladas após um ano e imediatamente acondicionadas em sacos plásticos, a fim de manter o sedimento depositado e preservar a integridade de organismos frágeis (e.g. ascídias, tufos). No barco, as placas serão desmontadas sobre bandejas plásticas e “rinsadas” com água do mar. Os sedimentos serão armazenados em recipientes plásticos refrigerados. Cada face de cada placa será fotografada e as placas serão preservadas em formalina a 10%, protegidas da luz.

- Comunidade de organismos nas CAUs

As imagens das placas serão utilizadas para identificar e determinar a abundância de organismos colonizadores (%) com uso do software ImageJ 1.48. A área de cada organismo será obtida através do contorno de seu perímetro na imagem, com uso de mesa digitalizadora. O percentual de cobertura será relativo à área total da superfície da CAU (400 cm²). Organismos calcificadores e não calcificadores serão identificados e comparados com os dados de Reis et al. (2016). Especialistas auxiliarão na identificação de grupos específicos (e.g. ascídias e briozoários).

- Análise de sedimento nas CAUs

Em laboratório, as amostras de sedimento serão decantadas e o excesso de água será removido com bomba peristáltica. Em seguida, os sedimentos serão lavados duas vezes com água deionizada, centrifugados e liofilizados. A mineralogia será determinada através de difração de raios X em um PANalytical X' Pert Pro Multipurpose Powder Diffractometer (geometria Bragg-Brentano, radiação $\text{CuK}\alpha$, gerador: 40 mA and 40 kV, amplitude angular 5-90° 2 θ , tomada a cada 0.02°, 180 s por medida). As análises difratométricas serão feitas em triplicata e as amostras serão previamente moídas 2 vezes, por 10 min., e filtradas em malha de 2 μm . A identificação das fases cristalinas, na forma de picos no difratograma, será feita no software Panalytical X' Pert Pro V3, baseada na comparação com dados de minerais de origem orgânica e inorgânica (e.g., Crystallographic Open Database - COD). A quantificação de fases cristalinas e parâmetros de rede serão baseadas na técnica de refinamento Rietveld, com uso do software MAUD, também usado para determinar a porcentagem de substituição de Mg por cristais de calcita (Titschack et al. 2011).

- Produção de CaCO_3 nas CAUs

As placas serão lavadas separadamente (3x) em solução de hidróxido de cálcio em água deionizada (pH 10), para evitar desmineralização, e posteriormente secas a 60 °C por 5-6 dias até o peso se estabilizar. O material seco será raspado, triturado em moinho de bolas e pesado para obtenção da massa total (calcária e não calcária). Em seguida, alíquotas pulverizadas de 50 mg serão analisadas por difração de raios X, conforme descrito acima. Após a difratometria o material será calcinado a 500°C por 6 dias ou até apresentar peso constante. A massa orgânica será obtida pela subtração da massa total da massa calcinada. O restante do material será submerso em solução a 5% de HNO_3 por 5 h, para dissolução do CaCO_3 , e posteriormente lavado com água deionizada, centrifugado, seco a 60°C durante 5 dias e pesado. A massa carbonática será obtida subtraindo a massa calcinada da massa de cinzas. Para determinar a produção de CaCO_3 , a massa carbonática será normalizada em função da área da CAU e do tempo total de colonização (t), resultando numa taxa de acúmulo líquido de CaCO_3 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{t}^{-1}$)

Os contrastes serão feitos com análises de variância (ANOVA) ou outras ferramentas estatísticas uni e multivariadas. Para identificar afinidades entre grupos de organismos colonizadores serão utilizadas estatísticas multivariadas (e.g. escalonamento multidimensional não-métrico - NMDS). A contribuição das variáveis abióticas (e.g. PAR, temperatura) será avaliada com análises de redundância, regressões múltiplas multivariadas, ou modelos lineares (e.g. Distance-based Linear Models), com uso dos softwares PRIMER, PERMANOVA e STATISTICA, ou no ambiente R (R Core Team, 2018).

- Temperatura e luminosidade

Sensores HOBO Pendant Light Data Logger (64K-UA-002-64) implantados junto às CAUs farão o registro da temperatura da água a cada 3 h no período de 12 meses. A intensidade da luz será estimada em LUX, usando os dados dos primeiros 10 dias após a instalação. Valores de radiação

fotossinteticamente ativa (PAR) serão obtidos com base em fatores de conversão para μE . A extração dos dados será feita com o software Hoboware.

- Caracterização quali- e quantitativa do sedimento das caus e armadilhas de sedimento

As amostras das CAUS serão processadas conforme descrito anteriormente. As armadilhas de sedimento serão recolhidas e reinstaladas trimestralmente, transportadas para a superfície com tampas plásticas herméticas de forma a impedir a perda de material fino. Os sedimentos serão transportados para o laboratório em recipientes plásticos refrigerados, no escuro, após decantação e remoção do excesso de água.

- Mineralogia e Granulometria

Os sedimentos (n=3 réplicas por estação) serão analisados por difração de raios-x, conforme protocolo acima. Será usada alíquota de 50 mg do sedimento de cada estação, a qual será liofilizada, triturada em moinho de bolas e filtrada em malha de 25 μm .

Serão coletados 3 tubos com sedimento de cada estação, totalizando ~100 g. O material será seco por liofilização durante 48 h e passado por peneiras (4, 2 e 1 mm; 500, 250, 100, 50, 25 e 4 μm) empilhadas sobre agitador eletromagnético, durante 1 h. Cada peneira será pesada em balança digital antes e depois da filtragem, para cálculo da porcentagem de sedimentos retidos. Os sedimentos serão classificados com base na escala granulométrica de fragmentos clásticos de Wentworth, como segue: Argila (<0,004 mm); Silte (0,004–0,064 mm); Areia (0,064–2 mm); Grânulo (2–4 mm); Seixo (4–64 mm).

- Processamento de amostras para toxicologia

As amostras a serem coletadas para estudos toxicológicos no âmbito do Anexo 1 abrangem uma espécie de macroalga, uma espécie de esponja e duas espécies de corais, coletadas semestralmente. As amostras serão alíquotadas para análises de metais e biomarcadores, sendo preservadas com identificação individual em freezer e nitrogênio líquido, respectivamente.

- Caracterização de comunidades recifais bentônicas

-Amostragem quali-quantitativa com fotoquadrados

A abordagem para detectar a dinâmica das assembléias bêmicas recifais é centrada em amostras repetidas realizadas em parcelas fixas, de forma a controlar a heterogeneidade espacial da área de estudo. Esse monitoramento será baseado em imagens obtidas com os fotoquadrados cujas dimensões estão descritas acima e cujo posicionamento será fixado com vergalhões metálicos fincados ao recife. Cada sítio contará com pelo menos 10 parcelas distribuídas aleatoriamente no tempo zero, ao longo de transecções com 30–50 m, tanto no topo (iluminado e aproximadamente horizontal) quanto na parede (sombreado e inclinado) das estruturas recifais. O processamento das imagens será feito na plataforma Coral Net conforme descrito acima, porém com uso de 30 pontos de anotação por imagem. Complementarmente, será feito imageamento hiperspectral em parcelas

selecionadas (n= 5), visando acelerar e ampliar a resolução taxonômica do processamento semi-automatizado, conforme Chennu et al. (2017). Os dados de cobertura bêntica serão processados com os softwares PRIMER, PERMANOVA e no ambiente R, buscando estabelecer contrastes espaciais e temporais, bem como associações com os parâmetros físico-químicos.

- Parâmetros Físico-Químicos da coluna d'água

Em cada estação amostral será realizada perfilagem com CTD e ADCP, aos quais será acoplado instrumental multiparamétrico para aquisição de dados de turbidez, fluorescência e pH (Plataforma Seaguard, Aanderaa). Em estações representativas da área de estudo também serão feitas medidas contínuas (fundeios) abrangendo pelo menos um ciclo de marés (e.g. Atamanchuk et al. 2015, Wesslander et al. 2011). Os dados físico-químicos serão descarregados e checados a bordo, com pré-processamento no software AADI Real Time Collector e Data Studio.

Complementarmente serão extraídos, através de sensoriamento remoto, dados de atenuação da luz (turbidez), temperatura superficial do mar (SST), clorofila a (Chla) e radiação fotossinteticamente ativa (iPAR), na escala regional e para os períodos amostrais cobertos pelo projeto. A extração, processamento e exploração dessas variáveis será feita em ambiente R, integrado ao Sistema de Informação Geográfica (SIG) do projeto (ArcGIS/ESRI). Os produtos processados são derivados do sensor MODIS (MODerate Resolution Imaging Spectroradiometer), acoplado ao satélite Aqua e disponíveis em série histórica de 15 anos (2003-2018) com resolução temporal de dois dias e resolução espacial de 4 km. As variáveis serão obtidas em repositórios da National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) dos EUA. Os valores de K490 (Diffuse Attenuation Coefficient, 490nm), Chla e iPAR serão obtidas no ERDDAP (Easier Access to Scientific Data), com dados calibrados pelo Ocean Biology Processing Group (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>), ao passo que os valores de SST (4 □, nighttime) serão adquiridos na PO.DAAC (Physical Oceanography Distributed Active Archive Center).

- Avaliação da condição fisiológica de corais

A condição fisiológica de corais será avaliada por fluorimetria de pulso modulado (Ralph & Gademann, 2005). Essa abordagem permite acessar a atividade fotossintética dos endossimbiontes por meio de curvas rápidas de luz (i.e. Rapid Light Curves - RLC's), bem como descrever o estado atual de seu aparato fotossintético e fazer inferências sobre o regime de luz ao qual o coral foi recentemente submetido. Os dados extraídos do fluorímetro (Diving-PAM I, blue light) serão pré-processados com o software WinControl (WALZ, Germany) e analisados de acordo com Ralph & Gademann (2005), visando obter: capacidade fotossintética máxima (rETR_m), irradiância mínima saturante (E_k) e Rendimentos Quânticos Complementares (ϕ PSII, ϕ NPQ, ϕ NO). Esses parâmetros serão analisados no ambiente R, com o objetivo de estabelecer contrastes espaciais e temporais, bem como associações com parâmetros físico-químicos do ambiente. Nesse sentido, também serão feitas comparações entre curvas, análises fatoriais e análises multivariadas (e.g. PCA).

- Caracterização de simbioses de corais

- Análise qualitativa e quantitativa de zooxantelas

Visando normalizar a densidade de simbioses e pigmentos, as imagens dos espécimes de corais dos quais foram raspados tecidos serão processadas no módulo de análise de área e comprimento do software Coral Point Count with Excel Extensions - CPCe (Kohler & Gill, 2006). A escala das fotos será calibrada convertendo-se o valor de pixels em cm, usando como base a régua da imagem.

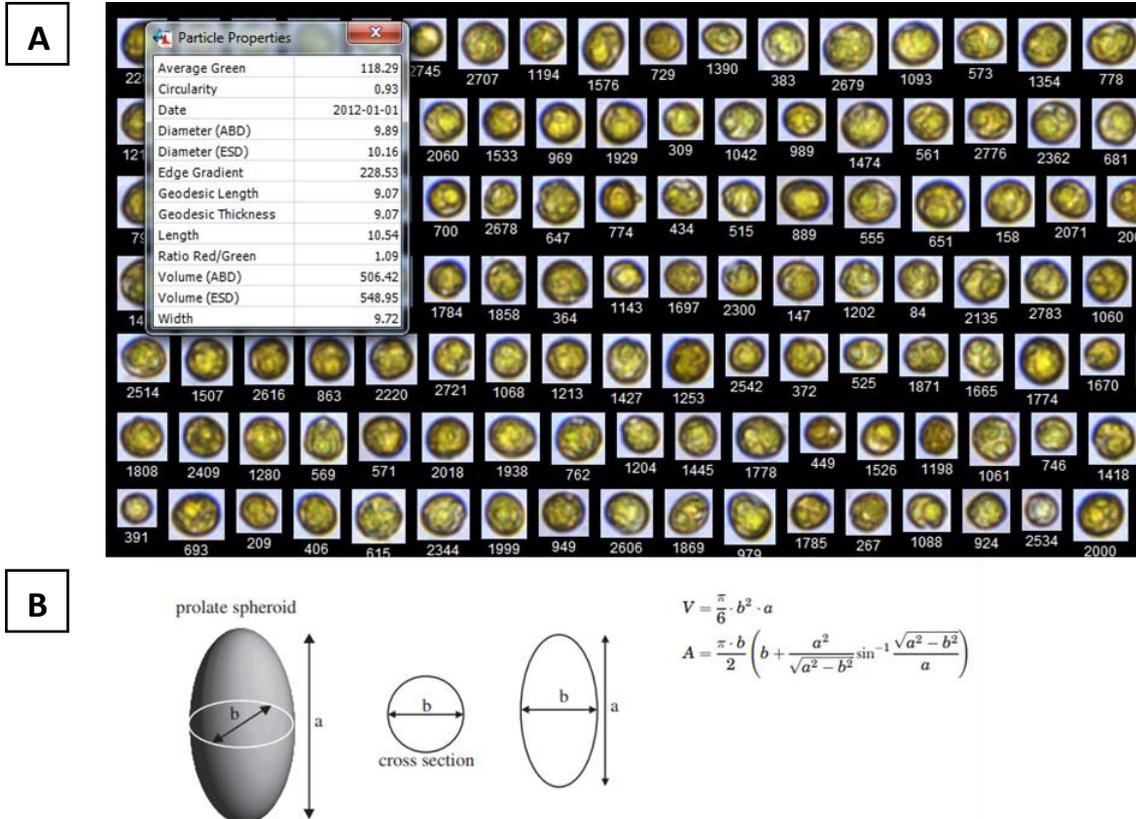
- Caracterização citométrica de zooxantelas

As suspensões de tecido, fixadas em paraformaldeído 1% logo após a coleta, serão homogeneizadas em vortex e submetidas a um sonificador com sonda de 3mm de diâmetro (Cole Palmer CPX 130) por 30 segundos, em pulsos intervalados de 1 segundo a 20% de amplitude, visando romper grumos de células. A suspensão será filtrada em malha de nylon de 45 μm para remoção de partículas maiores (e.g., sedimento, fragmentos de esqueleto). Esferas de poliestireno fluorescentes (diâmetro nominal de 3 μm) serão adicionadas às amostras como controles internos. Alíquotas da suspensão serão analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica (Cytotflex, Beckman-Coulter) utilizando laser azul (488nm) para excitação, sob fluxo de 50-100 $\mu\text{L min}^{-1}$ durante por 2 a 5 min. Células de endossimbioses serão discriminadas em citogramas de luz espalhada frontalmente (FSC-H, proxy para tamanho celular) por fluorescência da clorofila (FL3-H). Dados de contagens celulares, espalhamento de luz e fluorescência da clorofila serão exportados com o software do fabricante. Os valores de FSC-H e FL3-H serão normalizados por valores das beads de cada amostra (FL3-H, 670 nm) e as densidades de células serão expressas por unidade de área de coral.

- Caracterização morfológica de zooxantelas

Para análises morfométricas e estimativas de biovolume de zooxantelas, uma alíquota da suspensão de cada coral será analisada em sistema de imageamento em fluxo (FlowCam® model VS, Fluid Imaging Technologies) com célula de fluxo FOV de 90 μm e fluxo de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. As células serão imageadas em objetiva de 20X de aumento e taxa de aquisição de 20 imagens.segundo⁻¹. Células em foco serão selecionadas semi-automaticamente para medições com o software VisualSpreadsheet (Fluid Imaging Technologies) (Figura 1A). Comprimento e largura serão usados para estimativas de biovolume (μm^3 célula⁻¹) através da aproximação do formato de um esferoide prolado (Sun & Liu, 2003; Figura 1B).

Figura 1. (A) Imagens obtidas com o software VisualSpreadSheet. A janela “particle properties” indica os valores dos parâmetros medidos para cada célula. (B) O esquema geométrico representa a aproximação do formato celular com a equação para o cálculo de biovolume (conforme Sun & Liu, 2003). Na equação, “b” representa a largura das células e “a” o comprimento.



- Caracterização genética de zooxantelas

Extração de DNA

As amostras preservadas em nitrogênio líquido serão descongeladas no gelo e no escuro, e uma alíquota de 300 µL será armazenada por uma semana em microtubo com 500 µL de CHAOS Buffer (4M tiocianato de guanidina, 0.1% solução de N-lauroyl sarcosina, 10 mM Tris pH8, 0.1M 2-mercaptoetanol), segundo protocolo de Fukami et al. (2004). Posteriormente, será adicionado volume equivalente de buffer de extração de fenol (PEB -100 mM TrisCl pH8, 10 mM EDTA, 0.1% SDS), e o DNA Total será extraído com o método Fenol/Clorofórmio, seguido de precipitação por etanol e ressuspensão em TE (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) com RNase (10 mg/ml).

- Amplificação e sequenciamento

A comunidade de zooxantelas será caracterizada com base na região nuclear do espaçador interno dois transcritos do DNA Ribossomal (ITS2), a qual é amplamente utilizada para caracterização dos grupos de Symbiodiniaceae (LaJeunesse & Pinzón 2007, Stat et al. 2011). A região ITS2 será

amplificada com os iniciadores descritos em Pochon et al. (2001) e com iniciador sintetizado com as sequências adaptadoras necessárias para o protocolo de sequenciamento escolhido (Quigley et al. 2016).

Os tubos com reagentes e DNA serão submetidos a ciclos de temperatura no termociclador MiniAmp (Applied Biosystems). Inicialmente será realizado um ciclo a 95°C por 2 min. para abertura da dupla fita de DNA, seguido de 35 ciclos que se iniciam pela temperatura de desnaturação (95°C) por 45 segundos, seguido por 45 segundos na temperatura ótima de adesão dos iniciadores (56°C) e de 45 segundos a 72°C para extensão das fitas pela enzima Taq polimerase. Por fim, será mantida a temperatura de 72°C por 5 min. para a polimerização de fitas inacabadas. Os produtos resultantes dessa reação serão verificados em uma corrida de eletroforese com gel de agarose (1,5%). As amostras serão misturadas ao corante de DNA GelRed (Biotium) para visualização em transiluminador ultravioleta. A quantidade e tamanho dos fragmentos serão estimados por comparação com escada padrão (100 pb Plus DNA ladder), para confirmação da amplificação.

Sequências de amostras ambientais serão obtidas por sequenciamento de nova geração na plataforma MySeq Illumina, seguindo o protocolo de Arif et al. (2014) adaptado por Alanagreh et al. (2017). Serão gerados cerca de 30K em reads para cada amostra, buscando representar a diversidade dos organismos mais frequentes. A reação de ligação de adaptadores de biblioteca, para que as sequências possam ser separadas posteriormente, serão realizados em laboratório comercial especializado, assim como a reação de sequenciamento e geração dos dados de leituras. Os dados brutos serão tratados no software MOTHUR (Schloss et al 2009) e as sequências com baixos valores de qualidade (QC<30) e tamanhos <200 bp serão retiradas.

As sequências de ITS2 para cada biblioteca serão ranqueadas de acordo com a frequência em que aparecem na amostra. As dez sequências mais frequentes serão comparadas com dados do GenBank através da ferramenta BLAST. A identificação será baseada nos valores de Identidade mínimos de 50 e E-value de 1×10^{-5} . Serão realizadas análises filogenéticas para verificação e validação taxonômica. Para isso, as sequências serão alinhadas com o algoritmo Clustal e o melhor modelo evolutivo será inferido com a ferramenta JmodelTest. As análises filogenéticas serão realizadas por método Bayesiano no software MRBAYES 3.2.3 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Índices de diversidade serão computados para cada colônia, para os conjuntos de colônias de uma mesma espécie, entre a mesma espécie em pontos de coleta distintos, e submetidas a contrastes.

- Caracterização das comunidades planctônicas associadas aos fundos recifais

- Análise qualitativa e quantitativa do plâncton
- Quantificação por citometria de fluxo multiparamétrica

As frações do pico-, nano- e parte do microplâncton mais abundantes serão quantificadas por citometria de fluxo multiparamétrica em citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter) equipado com lasers violeta (405nm), azul (488nm) e vermelho (628nm). Antes das análises, as amostras

armazenadas em N-líquido serão descongeladas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A fração autotrófica (cianobactérias e eucariotos unicelulares clorofilados) será analisada de acordo com Dubelaar & Jonker (2000) e Marie et al. (2014). O limiar de detecção (threshold) será aplicado ao sinal de fluorescência vermelha emitida pela clorofila (canal FL3-H). Amostras serão aspiradas a uma velocidade entre 50 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 1 a 5 min. Serão coletados sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H), de fluorescência da clorofila, e dos pigmentos acessórios ficoeritrina e ficocianina, nos sensores correspondentes aos picos de emissão destes pigmentos. A fração heterotrófica (bactérias e eucariotos unicelulares) será analisada de acordo com Mari et al. (1997). Alíquotas de 180 μL de cada amostra serão coradas com fluorocromo para ácidos nucleicos SYBR Green I. Esferas fluorescentes de poliestireno de 1 μm serão adicionadas como controle interno. As amostras serão incubadas a temperatura ambiente por 15 min. antes da citometria de fluxo, a uma velocidade entre 20 e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, por 1 a 2 min.. O threshold será aplicado ao sinal de fluorescência verde emitida pelo fluorocromo (canal FL1-H). Serão coletados os sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H) e os sinais de fluorescência do SYBR Green I e pigmentos fotossintéticos.

Para o processamento dos dados citométricos, os arquivos gerados pelo citômetro, no formato FCS, serão analisados no programa FlowJo (FlowJo, LLC) , visando a delimitação de populações alvo e cálculos de concentração de células.

- Diversidade citométrica

Os dados citométricos serão processados no software FlowJo para remoção de partículas detriticas, ruído eletrônico e a população de esferas de controle interno. As estimativas de diversidade utilizarão os arquivos FCS previamente tratados, seguindo a rotina de agrupamento de Props et al. (2016) no ambiente R. Os parâmetros de interesse para as análises de diversidade citométrica serão: espalhamento de luz frontal e lateral (FSC-H e SSC-H) e os sinais de fluorescência dos pigmentos naturais das células (clorofila, ficoeritrina e ficocianina). O índice adotado será a série de Hill (1973), considerado ecologicamente mais significativo. Também serão calculados índices de riqueza (eq. 1), diversidade exponencial de Shannon (eq. 2) e diversidade de Simpson (eq. 3).

$$D_{q=0} = S \quad \text{eq. 1}$$

$$D_{q=1} = e^{-\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)} \quad \text{eq. 2}$$

$$D_{q=2} = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2} \quad \text{eq. 3}$$

- Análises quali- quantitativas por microscopia

Após a chegada ao laboratório, amostras do plâncton (2L) fixadas em formaldeído 2% serão sedimentadas por 7 dias, com posterior remoção de 90% do volume do sobrenadante. O volume restante, contendo as células sedimentadas, será transferido para frasco âmbar de 250 mL e

estocado em geladeira. As amostras concentradas serão analisadas em sistema automatizado de imageamento em fluxo e através de microscopia invertida, conforme descrito a seguir.

- Análise de comunidades planctônicas por imageamento em fluxo

Células do plâncton na faixa entre 5 e 100µm serão analisadas em um sistema automatizado de imageamento em fluxo (FlowCam, Fluid Imaging Technologies) conforme Sieracki et al. (1998) . Alíquotas de 10 mL das amostras concentradas serão filtradas em malha de nylon de 100µm para remoção de partículas grandes que possam obstruir as linhas do equipamento. As análises serão realizadas em modo autoimage com fluxo de 100µL min⁻¹ por 20 a 30 min, com célula de fluxo FOV de 90µm e objetiva 10X. O processamento de classificação e análise morfométrica será feito com o software VisualSpreadSheet.

- Análise de comunidades planctônicas em microscopia invertida

Organismos do fito- e protozooplâncton na faixa de >10µm serão quantificados conforme Uthermöl (1958) e Lund et al. (1958), usando volumes de 10-100mL de amostra sedimentadas por 24-72h. Os organismos serão quantificados em microscópio invertido de campo claro sob aumento de 10-20 e identificados no menor nível taxonômico possível com base em Tomas (1997), Sournia (1986), Richard (1987) e Chrétiennot-Dinet (1990).

- Quantificação de pigmentos

A análise quali e quantitativa de pigmentos clorofilianos no tecido de corais e na água será feita através de extração em acetona e detecção por espectrofluorimetria, usando os protocolos de extração e análises descritos a seguir.

A extração dos pigmentos clorofilianos contidos nas suspensões de células de tecidos de coral será realizada em acetona 90%. As amostras serão filtradas em filtros GF/F de 47 mm de diâmetro para concentrar a suspensão e retirar o excesso de água. Em seguida, os filtros serão transferidos para tubos de vidro com 6 mL de acetona 90% e macerados com bastão de vidro. Após esta etapa, os tubos serão selados com Parafilm e submetidos a banho sonificador por 2 min. a 4°C. As amostras serão armazenadas a -20°C por 12h, centrifugadas a 2500 rpm por 10 min., e as fluorescências dos extratos serão medidas em um espectrofluorímetro VARIAN (CARY ECLIPSE). As concentrações de clorofilas e feofitinas serão calculadas segundo o método de Neveux & Lantoine (1993) modificado por Vanzan et al. (2015). Para isso, será feita a aquisição de 31 espectros de emissão de fluorescência entre comprimentos de onda de 615 e 715nm, com resolução de 2nm e excitação entre 390-480 nm com resolução de 3nm.

Para extração dos pigmentos clorofilianos na água, os filtros GF/F com material coletado em campo serão transferidos dos tubos criogênicos de armazenagem para tubos de vidro com 6mL de acetona a 90%. Em seguida, os filtros serão macerados com bastão de vidro e os tubos com extratos acetônicos serão selados com Parafilm e mantidos a 4°C ao abrigo da luz por 12 h, sendo subsequentemente centrifugados por 10 min. a 2500 rpm. As fluorescências dos extratos serão

medidas no espectrofluorímetro e as concentrações pigmentares serão obtidas com os mesmos procedimentos usados para análise de pigmentos em tecidos de corais, conforme descrito acima.

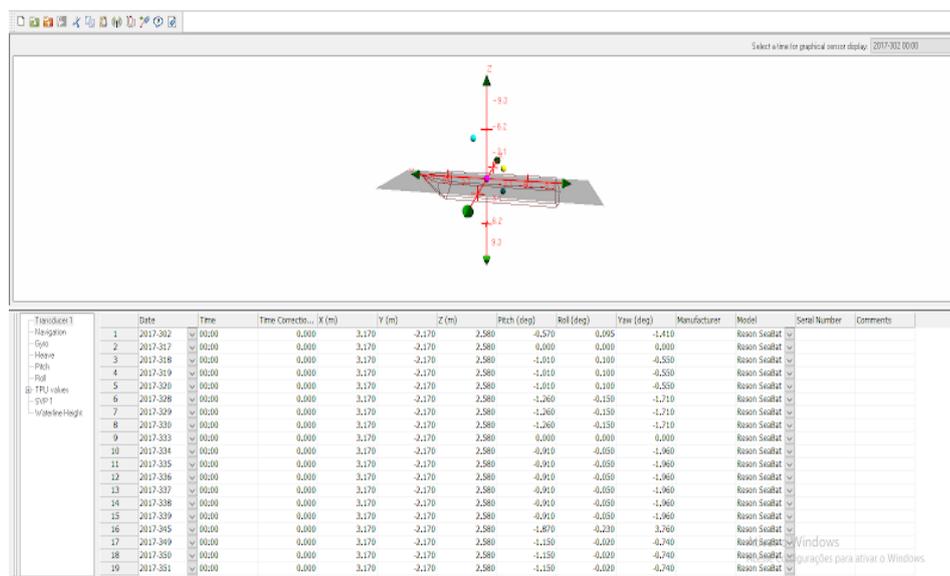
4.2.5. Matriz leito marinho

a) Sistema de batimetria multifeixe

O processamento dos dados de ecobatimetria multifeixe será realizado através da plataforma CARIS e do pelo pacote do QPS (QINSy Offshore Bundle), envolvendo diversas etapas desde a criação do arquivo da embarcação para o levantamento hidrográfico até a exportação dos produtos finais (arquivos “XYZ”, perfis batimétricos e imagens georreferenciadas).

A criação do arquivo de embarcação envolve diversas informações referentes às/aos: dimensões da embarcação; *offsets* dos sensores (visualização tridimensional); resultados das calibrações (patch test) do ecobatímetro multifeixe; valores de incerteza associadas a todas as medições dos *offsets* e aos dados fornecidos pelos sensores (Total Propagated Uncertainty – TPU); valores de draft (distância vertical entre a base do ecobatímetro e a linha d’água) e; valores de waterline (distância vertical entre a linha d’água e o horizonte de referência na embarcação). A inserção de todas essas informações é essencial para assegurar e validar a precisão dos dados batimétricos coletados (Figura 18).

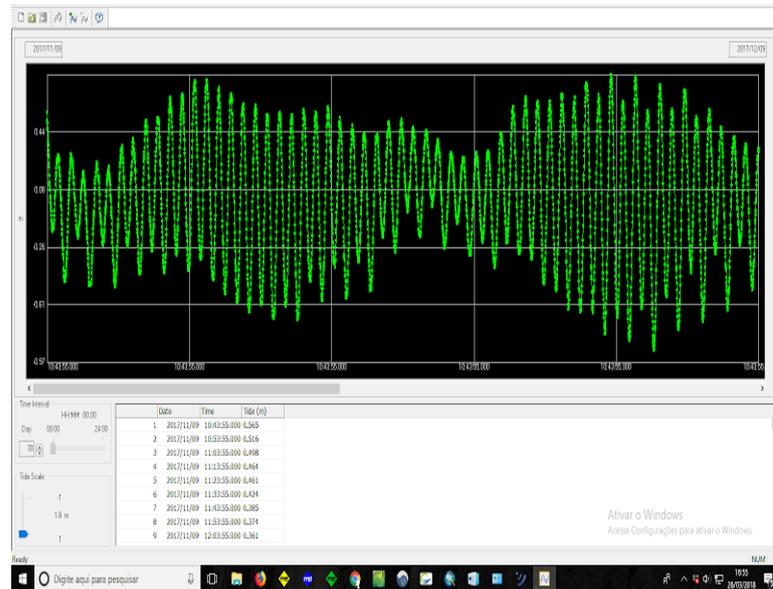
Figura 18. Exemplo do arquivo de embarcação para o levantamento batimétrico.



Os dados batimétricos brutos incluem as variações do nível da água causadas por vários tipos de ondulações (geradas por vento, maré, dentre outros). Como uma mesma região pode ser mapeada em períodos diferentes, é possível que seus dados apresentem diferenças verticais quando comparados. Para minimizar esses erros verticais faz-se necessária a correção dos dados a um único

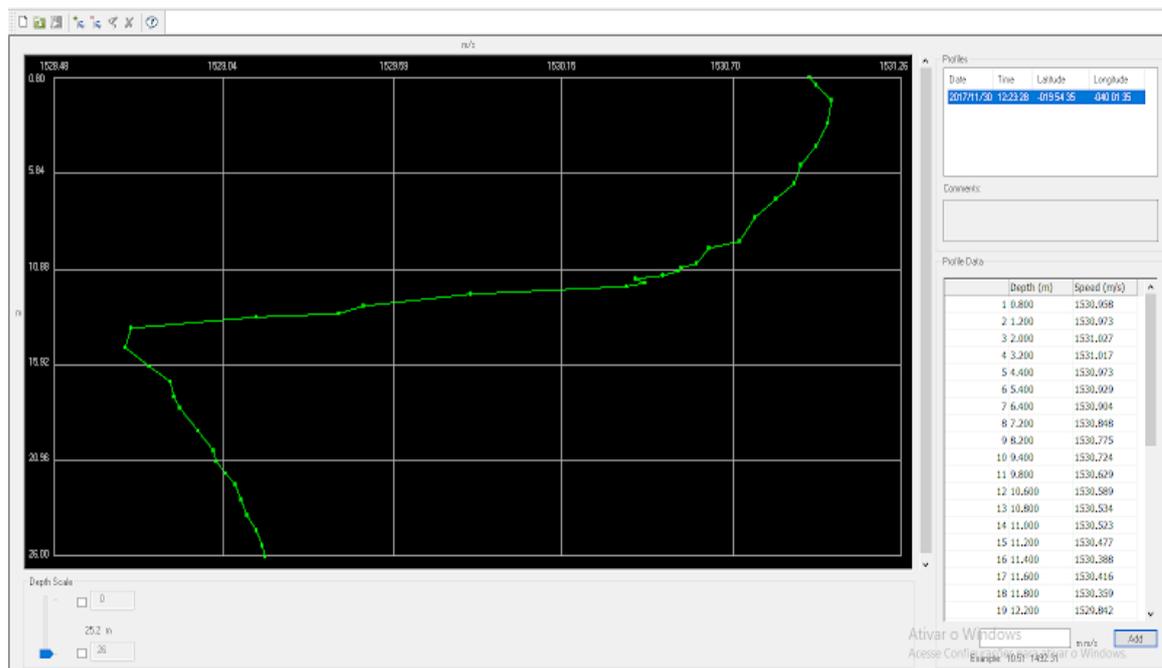
nível de redução (NR). Este procedimento consiste em utilizar dados coletados por marégrafos e/ou sensores de pressão e aplicá-los nos dados brutos para então reduzir as profundidades a um mesmo referencial vertical (Figura 19).

Figura 19. Exemplo de curva de nível.



Uma outra etapa importante do processamento de dados de ecobatimetria multifeixe é a correção do efeito de refração do pulso acústico ao longo da coluna d'água. Após ser emitido pelos transdutores do ecobatímetro o pulso acústico percorre a coluna d'água, é refletido pelo fundo marinho, retorna pela coluna d'água e por fim, é então reconhecido pelos receptores. Como resultado, o equipamento faz uma interpretação do tempo gasto pelo pulso acústico para fazer esse percurso e calcula a distância percorrida pelo mesmo; ou seja, a profundidade local. Entretanto, por se tratar de uma onda acústica, o pulso pode sofrer alterações em seu percurso (refrações) devido a diferentes valores de velocidades do som observados ao longo da coluna d'água. No caso destes dados, por se tratarem de pulsos acústicos produzidos por um ecobatímetro multifeixe, essa correção acaba sendo ainda mais necessária, em função da grande variação angular entre seus feixes, sendo os mais externos os que são geralmente mais afetados. Como resultado, o fundo marinho pode se apresentar de maneira a não representar o fundo marinho de maneira real. As variações verticais desta propriedade são monitoradas ao longo do levantamento hidrográfico através da coleta de dados em perfis com um SVP para acompanhar em detalhe essas variações (Figura 20).

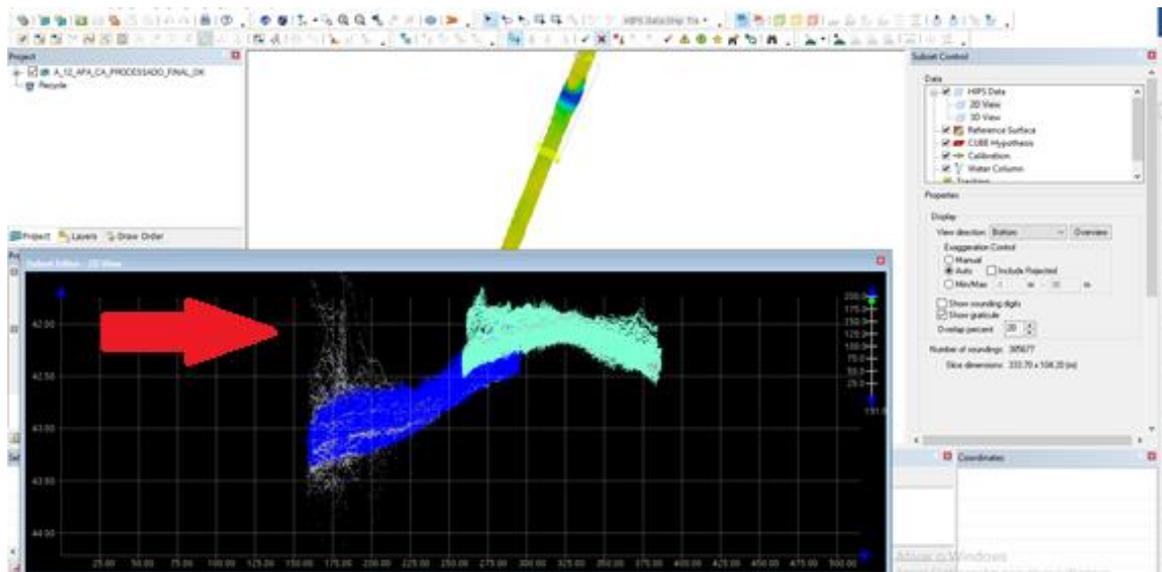
Figura 20. Exemplo para um perfil de velocidade do som.



Após estes procedimentos iniciais faz-se a realização do patch test, uma vez que ao longo do levantamento dos dados batimétricos a embarcação está sujeita a movimentos de rotação (pitch, roll, yaw), que descrevem a translação no eixo vertical (heave) e suas ações ao longo da sondagem. Estes efeitos são corrigidos por meio de um alinhamento entre os sistemas e medição dos seus offsets.

O patch test consiste na determinação dos desvios em pitch, roll e yaw do transdutor e sensor inercial e da latência entre os sistemas (diferença entre os tempos de processamento das observações e a saída dos dados para os sistemas de aquisição). O patch test fornece os ângulos de montagem dos sensores. O procedimento final, consiste na retirada dos dados espúrios (spikes) (Figura 21).

Figura 21. Exemplo de dados batimétricos com dados espúrios para serem retirados.



Por seguinte ao processamento e correção dos fatores que geram interferência nos dados, serão gerados modelos digitais de profundidade da cobertura total de fundo e arquivos “XYZ” dos dados, ambos com uma resolução de 0.50 metro. Além de mapa batimétrico da cobertura espacial de fundo de toda área levantada. Após estas etapas os dados passaram pelo processamento para obtenção do backscatter.

b) Sistema sísmico de alta resolução

O processamento dos dados será realizado no software MDPS aplicando-se filtros de frequência do tipo passa-banda e ganho de acordo com as características do dado sísmico objetivando melhorar a qualidade do mesmo.

A interpretação será realizada através do mapeamento de horizontes sísmicos gerando informações de espessura do depósito sedimentar. A conversão do tempo duplo de propagação (two-way time) para profundidade será estimada empregando-se uma velocidade média de 1500 m/s. Os mapas de isópacas serão confeccionados no software ArcGIS 10.4.

c) Video-monitoramento dos habitats

As filmagens serão visualizadas no Windows Media Player e imagens de fundo serão selecionadas para análises detalhadas com objetivo de representar as principais características do fundo. Um sistema de classificação de tipos de fundo será definido para as imagens da TC. As imagens obtidas com dropcameras serão analisadas quantitativamente para determinação de fundos de rodolitos e fundos recifais. Neste caso os registros videográficos deverão ser selecionados e recortados em 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).

4.3. ANEXO 3 - MONITORAMENTO AMBIENTAL NO RIO DOCE, ÁREA ESTUARINA E MARINHA – SISTEMA AQUÁTICO DULCÍCOLA

4.3.1. Matriz coluna d'água

a) Hidrodinâmica

Monitoramento de vazões e descargas sólidas no estuário do rio Doce tem sido feito a partir das medições de vazão e fluxos d'água medidos em 4 seções com o uso do equipamento ADCP. Os dados são processados em software específico para tal finalidade.

Os dados de vazão serão avaliados segundo sua sazonalidade e os dados de fluxos d'água serão avaliados segundo sua sazonalidade e variação semi-diurna (maré). Níveis d'água são medidos com sensor de pressão e armazenados em datalogger. Esses dados, então, são tabelados e comparados com variação de vazões afluentes à região estuarina e variações de maré.

Para estimativas de descargas sólidas são coletadas amostras de água nas mesmas seções em que são feitas as medições de vazão, para análise de sedimentos suspensos, e amostras de sedimentos de fundo. As medições de descargas sólidas de sedimentos em suspensão, então, são realizadas pelo método Igual Incremento de Largura, com uso de amostrador de integração na vertical. As amostras coletadas são enviadas ao LABHIDRO para análises de concentração e granulometria de sólidos suspensos.

Assim, os dados para elaboração das curvas granulométricas dos sedimentos em suspensão são obtidos através do Método do Tubo de Retirada pela Base (Carvalho, 2008). A classificação granulométrica dos sedimentos suspensos é feita segundo a American Geophysical Union. As concentrações de sólidos suspensos e dissolvidos são determinadas pelo mesmo método de análise, sendo obtidas concentrações de sólidos dissolvidos e sólidos suspensos em planilhas de cálculo.

São coletadas amostras de sedimento de fundo, com uso de draga, para determinação das distribuições granulométricas dos materiais dos leitos. As amostras são acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas para o LABHIDRO. As curvas granulométricas são obtidas a partir dos resultados das análises dos sedimentos realizadas pelo Método de Peneiramento e a classificação granulométrica dos sedimentos de fundo é feita segundo metodologia indicada pela American Geophysical Union (CARVALHO, 2008).

A equação abaixo é utilizada nas estimativas de descargas sólidas em suspensão, onde Q_{ss} é a descarga sólida em suspensão (t/d); Q é a vazão (m^3/s) e C_{ss} é a concentração de sedimentos suspensos (mg/L).

$$Q_{ss} = 0,0864.Q.C_{ss}$$

As descargas sólidas totais são estimadas pelo Método de Einstein modificado por Colby e Hembree (1955). Por este método as descargas totais de sedimentos são obtidas a partir de medições de descargas de sedimentos em suspensão nas partes superiores da seção do rio, entre a superfície e pontos localizados a uma pequena distância do fundo, e de extrapolação das cargas em suspensão medidas para a faixa situada próxima ao fundo (CARVALHO, 2008). Com uso da metodologia descrita, obtêm-se as descargas sólidas em suspensão, por arraste, e total.

Os cálculos são feitos a partir de parâmetros hidráulicos correspondentes às seções monitoradas, considerando as características do material amostrado em suspensão e no leito.

Os dados utilizados são:

- vazão (m^3/s);
- velocidade média de escoamento (m/s);
- área da seção transversal (m^2);
- largura da seção transversal (m);
- profundidade média das verticais de coletas de sedimentos (m);
- concentração de sedimentos em suspensão (ppm ou mg/l);
- distribuição granulométrica de materiais do leito e em suspensão coletados na seção (m);
- temperatura da água ($^{\circ}C$)

b) Modelagem hidrológica

A modelagem hidrológica do Baixo Rio Doce será desenvolvida com base em dados de pluviosidade e vazão da bacia hidrográfica do rio Doce. Serpa utilizado o modelo SWAT – Soil & Water Assessment Tool (Arnold et al., 1998).

- Dados pluviométricos

As estações pluviométricas existentes no interior e áreas lindeiras da bacia do Rio Doce foram identificadas por meio de consultas à Agência Nacional de Águas, Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper,

Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN) e Instituto Nacional de Meteorologia – INMET.

As estações existentes tiveram suas coordenadas geográficas determinadas em shapefile e seus dados foram analisados em termos de consistência, disponibilidade e modo de obtenção, tendo as mesmas sido divididas em dois grupos: (1). As estações que possuem longa série histórica e, (2) As estações que apresentam dados diários atuais. No grupo das estações de longa série histórica ocorrem as com séries descontinuadas e as que tiveram coleta de dados interrompidas. Assim, são consideradas aquelas com pelo menos 30 anos de dados contínuos entre 1985 e 2014. Este grupo é composto por 90 estações, todas operadas pela Agência Nacional de Água e Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (ANA/CPRM).

No grupo das estações com dados atuais estão incluídas aquelas cujos dados são disponibilizados na internet diariamente ou em tempo real. Tratam-se das estações operadas pelo INMET, CEMADEN e ANA, cujos dados estão sendo compilados diariamente para alimentar o modelo SWAT durante as simulações hidrológicas.

As estações que apresentam dados pluviométricos de longo prazo (1985 a 2014) tiveram seus dados compilados em planilha eletrônica e os totais pluviométricos anuais calculados.

As pluviosidades médias anuais foram interpoladas em sistema de informação geográfica utilizando o interpolador Inverse Distance Weight (IDW). Para a bacia do Rio Benevente, Silva e Caiado (2013) estudaram qual a melhor combinação de potência e número de pontos para a interpolação de dados pluviométricos utilizando o interpolador IDW. O estudo indicou que os melhores resultados foram obtidos com potência 2 e número de pontos igual a 6. Essa mesma combinação foi utilizada para a interpolação de dados pluviométricos na bacia do Rio Doce.

- Dados fluviométricos

As estações fluviométricas localizadas na bacia do rio Doce, assim como os responsáveis por sua operação, foram identificadas e em seguida espacializadas utilizando sistema de informações geográficas. Das estações identificadas nesta fase, algumas não estão mais em operação e outras apresentam séries históricas com muitas falhas ou estão localizadas muito próximas de outras. Assim, 39 estações foram consideradas adequadas para caracterizar fluviometricamente a bacia do rio Doce. Foram amostradas 39 estações fluviométricas ao longo da bacia do rio Doce. Destas, cinco estações estão localizadas na calha do rio Doce, cinco localizadas no rio Piranga e no rio Santo Antônio, quatro estações no rio Manhuaçu, três estações nos rios Itambacuri e Piracicaba, duas estações no rio Corrente, no rio Caratinga e no rio do Carmo e uma estação nos seguintes rios: Casca, Guandu, Guanhões, Matipó, Pancas, Sacramento, Santa Joana, Santa Maria do rio Doce e São José. O rio Suaçuí Pequeno possui uma estação (Fazenda Aconchego – encontra-se também espacializada), porém, a mesma possui poucos dados disponíveis, não constituindo uma série histórica e, portanto, não foi utilizada em análises estatísticas subseqüentes.

Os dados das estações foram consistidos em escritórios com a eliminação dos anos com falhas superiores a vinte dias e preenchimento de dados dos anos com menos de 20 dias de falha. Para o preenchimento das falhas, foram utilizados dados da estação mais próxima localizada e no mesmo curso d'água da estação com dados a serem preenchidos. Foram identificadas 38 estações, sendo que 36 tiveram o ano de 1988 eliminado devido ao grande número de falhas. A estação Dom Cavati teve três anos eliminados da análise (1988, 1991 e 1993), enquanto as estações Porto de Santa Rita, Instituto Florestal Raul Soares, Rio Piracicaba, Barra do Cuieté Jusante, Barra de São Gabriel, Colatina, Ponte do Pancas e Jusante Córrego da Piaba tiveram dois anos eliminados. Quatro estações tiveram dados preenchidos durante o processamento de consistência de dados, Instituto Florestal Raul Soares, Mário de Carvalho, Colatina e Jusante Córrego da Piaba.

Os dados fluviométricos diários de cada estação foram compilados em planilha eletrônica e calculada a vazão média para todo o período. Para cada ano, foram identificadas as vazões máxima e mínima e calculadas as médias das mesmas para a série histórica. Com o objetivo de se comparar a produção de água entre as diversas subbacias do rio Doce, as vazões médias das estações foram divididas pelas áreas de contribuição das mesmas, resultando na produção de água em L/s.km² (deflúvio areal médio).

- Base cartográfica

Juntamente com as análises pluviométrica e fluviométrica, foi realizado o levantamento dos dados cartográficos e topográficos de toda a bacia, os quais foram preparados para compor as informações de entrada do modelo SWAT. Foram preparados o Modelo Digital de Elevação (MDE) e os mapas Pedológico e de Uso e Ocupação do Solo. O MDE utilizado foi o disponibilizado no Portal para Informações e Dados Espaciais – GeoNetwork, da Agência Nacional de Águas – ANA. O MDE possui moderada resolução espacial (células de 10m) da bacia do rio Doce. Este foi criado a partir de Modelos Digitais SRTM (Shuttle Radar Topography Mission) e ASTER GDEM (Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer) e Global Digital Elevation Map. A interpolação utilizada para a elaboração do MDE com resolução de 10 m foi pelo método “Spline”. Além disso, foram utilizados os pontos cotados altimétricos para alocação de torres de transmissão de sinal de telefonia celular distribuídos aleatoriamente por toda a área do projeto, aprimorando a acurácia do dado. Para a área correspondente ao fuso 23 foram utilizados 9.720 pontos com as coordenadas planialtimétricas conhecidas e na área pertencente ao fuso 24 um total de 6.478 pontos. Como resultado foi gerado um MDE de Superfície (MDS) com uma precisão de 5 m na altimetria e 10 m na planimetria.

O Mapa de Uso e Ocupação do Solo utilizado é também disponibilizado pelo Portal para Informações e Dados Espaciais – GeoNetwork, da Agência Nacional de Águas – ANA. O mapa foi criado por meio de imagens de satélites ALOS, QUICKBIRD, WORLD VIEW I e LANDSAT-7 e o produto tem uma escala de interpretação de 10 metros compatível com escala 1:100.000.

Já, o Mapa Pedológico da bacia do Rio Doce foi criado em 2006 pela Diretoria de Geociências do IBGE e está disponibilizado pelo Portal FTP deste órgão em resolução 1:5.000.000.

c) Material particulado e suspensão

O material particulado em suspensão na coluna d'água são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.1.

d) Parâmetros físico-químicos

- Alcalinidade

Em uma amostra de água os íons da alcalinidade, resultantes da dissociação ou hidrólise de solutos, reagem com o ácido adicionado à amostra. A alcalinidade da amostra é relativa ao valor do ponto final de pH fixado (pH = 4,35) (Mackereth, Heron & Talling, 1978; APHA, 2005).

Equipamentos, vidrarias e reagentes utilizados: pHmetro, agitador magnético, barra magnética, bureta (automática ou de vidro), pipeta volumétrica (100 ml), béquer (250 ml), solução de ácido clorídrico (HCl) 0,02N.

As amostras são homogeneizadas e uma alíquota de 100 ml é transferida com uma pipeta volumétrica para um béquer. A amostra é submetida à leve agitação com um agitador magnético sendo inserido introduzido um eletrodo de pH, previamente calibrado. O compartimento da bureta automática ou uma bureta de 50 mL é preenchido com a solução de HCl 0,02N, sendo então acoplado ao conjunto béquer/eletrodo. Após a estabilização do valor do pH original da amostra a titulação é iniciada vagarosamente, sendo registrado em planilha o volume gasto da solução de HCl 0,02 N, até o valor de pH 4,35.

Cálculo da Alcalinidade total é feito da seguinte forma:

$$\text{Alcalinidade total} = \frac{\text{N HCl} \times \text{V HCl gasto} \times 50000}{\text{Volume (mL) da amostra}}$$

e) Nutrientes

Os nutrientes presentes na coluna d'água são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.1

f) Compostos orgânicos

Os compostos orgânicos presentes na coluna d'água são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.1.

g) Metais principais, traço e semimetais

Os metais traço e semimetais presentes na coluna d'água são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.1.

h) Elementar (particulados)

Devido a impossibilidade de realizar as análises de Enxofre (S) elementar no Departamento de Geociências da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), por não haver disponibilidade do módulo para análise de S, as amostras dos ecossistemas aquáticos continentais são analisadas por meio espectrometria de fluorescência por Raios-X de Energia dispersiva com limite de detecção de 0.0002% (w/w) conforme a Norma ASTM D 4294 – 08 (ASTM, 2008) no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A amostra é colocada em um cilindro irradiado por um tubo de Raios-X. A radiação-X característica excitada resultante é medida, e a contagem acumulada destas é comparada com as contagens previamente obtidas para os padrões de calibração. Para se determinar a quantidade de Enxofre Total por fluorescência de raios-X será utilizado um equipamento marca HORIBA, modelo SLFA-2800 com uma mesa rotatória composta de 8 compartimentos para a célula contendo a amostra.

Antes de iniciar a determinação do Enxofre Total por Fluorescência de Raios X, as amostras são preparadas em um conjunto formado por uma célula descartável e uma armação interna. Esta preparação é feita por meio de um encaixe da célula descartável dentro da armação interna da célula. A amostra é homogeneizada manualmente, sob agitação, por aproximadamente 2 minutos e transferidas para as células de amostras, sendo adicionados aproximadamente 5 mL de amostra líquida no conjunto célula descartável/armação interna.

i) Isótopos (particulados)

As análises das razões isotópicas e a análise elementar nas amostras de sedimento, seston e fontes da MO serão realizadas por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha), acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer - IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica concomitantemente às medidas de C e N, presente no laboratório do proponente. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. As dosagens de fósforo total serão realizadas por meio da técnica de espectrofotometria automatizada por injeção em fluxo (FIA; flow injection analysis) com o aparelho FIALab 2500 (FIALab, EUA) na Universidade Federal de São João del-Rei - UFSJ.

Antes e depois das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizados serão p.ex. IAEA-CH3 (Celulose), IAEA-600

(cafeína), IAEA N2 (sulfato de amônio) e IAEA-NO3 (nitrato de potássio). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no calcário de Viena Pee Dee Belemnite (V – PDB) para o C e nitrogênio atmosférico, N2, para o N. Serão utilizados ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas. Demais informações sobre o método se encontram em Gücker et al. (2011).

4.3.2. Matriz sedimento superficial

A amostragem do sedimento superficial dos ecossistemas aquáticos continentais tem sido realizada com amostradores em aço inox do tipo Van Veen para calha fluvial e do tipo Ekman em ecossistemas lacustres.

a) Aspectos físicos (Granulometria e Mineralogia)

A granulometria e mineralogia dos sedimentos superficiais são analisadas da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.2.

b) Teor de matéria orgânica total (MOT)

A matéria orgânica total dos sedimentos superficiais é analisada da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.2.

c) Nutrientes

O fósforo total nos sedimentos superficiais é analisado da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.2.

d) Metais

Os metais totais e os fracionamentos por diferentes extrações nos sedimentos superficiais são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.2.

e) Compostos orgânicos

Os compostos orgânicos nos sedimentos superficiais são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.2.

4.3.3. Matriz sedimento testemunho

a) Aspectos físicos (Granulometria e Mineralogia)

A granulometria e mineralogia dos sedimentos nos testemunhos são analisadas da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.3.

b) Minerais pesados

Os minerais pesados dos sedimentos nos testemunhos são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.3.

c) Teor de matéria orgânica total (MOT)

A matéria orgânica total dos sedimentos superficiais é analisada da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.3.

d) Metais

Os metais totais nos sedimentos superficiais são analisados da mesma forma que no ambiente marinho, conforme consta no item 4.2.3.

4.3.4. Matriz biota

a) Fitoplâncton

Para análise qualitativa do fitoplâncton na calha do rio e nos ambientes lacustres tem sido utilizado o método do arrasto superficial com rede de plâncton de abertura de malha de 20 μm , na subsuperfície (aproximadamente 30 cm de profundidade), sendo uma amostra por ponto amostral. A amostra coletada em cada ponto é dividida em duas partes, acondicionadas em frascos de polietileno (100 ml): uma será fixada com formol 4% - adicionar 10 mL; o outro frasco deverá ser mantido sem preservante, em caixa térmica com gelo permanente, para análise do material vivo em laboratório (não congelar). As espécies são analisadas em microscópio óptico equipado com ocular micrometrada e câmara clara. A identificação será realizada ao menor nível taxonômico possível usando bibliografias específicas.

Para o estudo quantitativo do fitoplâncton na calha do rio Doce, é preciso ser coletada uma amostra de 100 mL de água em cada ponto amostral, submergindo o frasco a 30 cm de profundidade. Nos ambientes lacustres, amostras de 100 ml de água devem ser coletadas na subsuperfície e na profundidade de 1% da radiação solar incidente na superfície, com garrafa de van Dorn. Assim, pode-se obter a variação vertical do fitoplâncton nos ambientes lênticos, que, aliada aos dados de perfilagem físicos, químicos e físico-químicos podem definir o padrão de funcionamento lacustre e fornecer respostas acerca da produtividade e sucessão de espécies relacionadas às mudanças ambientais espaço-temporais no sistema lacustre do Baixo Rio Doce.

Todas as amostras quantitativas (calha do rio e ambientes lacustres) devem ser acondicionadas em frascos de vidro âmbar (100 ml) e fixadas com solução de lugol acético. A densidade do fitoplâncton deve ser estimada pelo método de Utermoh (1958)I, em microscópio invertido em aumento de 400x, usando-se tempo de sedimentação de, pelo menos, 3 horas para cada centímetro de altura da câmara (Margalef, 1983). O volume sedimentado por amostra será de 10 ml.

A densidade fitoplanctônica (ind.ml^{-1}) deve ser calculada através da seguinte fórmula, descrita por Lund et. al. (1958):

$$(\text{ind.ml}^{-1}) = n\{1/[(sch)/1000 \times 100000]\}$$

Onde:

n = número de indivíduos contados

s = área do campo de contagem (μm^2)

c = número campos contados

h = altura da câmara (mm)

A diversidade da comunidade fitoplanctônica é determinada através do índice de diversidade de Shannon e Weaver (1949), a equitabilidade estimada segundo Pielou (1975) e a dominância estimada através do índice de Simpson (1949). A biomassa do fitoplâncton deve ser estimada através das concentrações de clorofila a determinada no subprojeto da Meta 1 dessa proposta. A ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas deve ser analisada segundo a lista de espécies tóxicas com ocorrência no Brasil, publicada por Sant'Anna et al. (2008).

A determinação da concentração de clorofila a nas amostras dos ecossistemas aquáticos continentais é realizada pelo método de fluorimetria, com extração em acetona 90% à frio e posterior acidificação para quantificação de feofintina (Strickland & Parsons, 1972; APHA, 2005). O método de extração e fluorimetria é considerado 50 vezes mais sensível do que a espectrofotometria (Jeffrey, 1997). Além da análise de clorofila a por fluorimetria possibilitar a quantificação em amostras de ecossistema aquáticos oligotróficos, permitirá a comparação com os dados de fluorescência *in vivo* obtidos com a perfilagem da coluna d'água com o uso da sonda YSI V6000.

b) Zooplâncton

Para a análise quantitativa do zooplâncton, toda a amostra é examinada. Para o microzooplâncton (rotíferos), subamostras de 1ml são analisadas em câmara de Sedgwick-Rafter em microscópio óptico equipado com ocular milimetrada. Para análise do mesozooplâncton (copépodos e cladóceros), toda a amostra é examinada em estereomicroscópio, com subamostras de 5ml tomadas da amostra total. São, então, obtidas imagens dos espécimes para a tomada de medidas morfométricas posteriores e análise taxonômica. Os espécimes triados são catalogados e mantidos na coleção do Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Ouro Preto.

As espécies zooplanctônicas são reunidas em categorias de constância de ocorrência, onde a espécie constante será aquela que possuir evidência em mais de 50% das amostras; a espécie acessória será a que estará presente em 25 a 50% das amostras; e a espécie acidental, em menos de 25% das amostras (Malabarba et al., 2004). Desta forma, são obtidos dados da densidade

(org/m³), riqueza e diversidade (H'), o tamanho corporal, bem como a proporção de fêmeas ovadas e número de embriões presentes na amostra para a estimativa de recrutamento.

A equitabilidade é expressa pelo Índice de Pielou:

$$J' = [H'(\text{observado}) / H' \text{máximo}]$$

Em que “H' máximo” representa a diversidade máxima possível que pode ser observada se todas as espécies apresentarem igual abundância : H' máximo = log S (número total de espécies).

A diversidade será expressa através da função entre o número de espécies e a equitabilidade dos valores de importância da mesma. Para tanto, é utilizado o índice de Shannon – Weaver (1949).

$$H' = - \sum p_i(\log p_i)$$

A biomassa zooplânctônica, por sua vez, é obtida com base no método alométrico, que consiste no uso de equações exponenciais, as quais relacionam dimensões lineares dos organismos e seu peso seco, por meio de regressões entre o comprimento do animal (μm) vs. o seu peso individual. As fórmulas a serem utilizadas são:

$$B = a.L^b$$

e

$$\ln B = c + b.\ln L$$

Onde c = ln a e “a” e “b” são coeficientes específicos para cada espécie zooplânctônica (Bicudo & Bicudo, 2007).

Modelos de variância (ANOVA, MANOVA) são utilizados de acordo com o teste de normalidade dos dados. Modelos gerais lineares (GLM ou GLLM) e de mínimos quadrados serão utilizados para avaliar a relação da característica limnológica dos sistemas estudados (parâmetros limnológicos obtidos no subprojeto de caracterização limnológica das lagoas) e indicadores contínuos e categóricos da comunidade zooplânctônica. A análise Canônica é uma técnica multivariada usualmente utilizada para constatar a associação entre o conjunto de variáveis (concentração de partículas orgânicas e inorgânicas) com outras variáveis (diversidade, abundância, riqueza e biomassa dos organismos zooplânctônicos).

c) Perifíton

As amostras da comunidade perifítica são coletadas mensalmente. Em cada uma das estações amostrais (e regiões das estações, no caso dos rios) são coletadas, no mínimo, três unidades de um tipo substrato (a quantidade de substratos coletados deverá conter uma quantidade de material suficiente para os procedimentos analíticos). O tipo de substrato escolhido deve ser comum às

estações amostrais. Os substratos devem ser coletados de forma que a área colonizada pelo perífiton possa ser determinada após a remoção do mesmo.

Os substratos com a presença do perífiton coletados e armazenados em frascos com pequena quantidade de água destilada (formando uma câmara úmida), em baixa temperatura em campo, são raspados com escova de cerda macia e jatos de água destilada.

Após a raspagem, as amostras para a análise qualitativa da comunidade são fixadas com solução formalina a aproximadamente 4% (4 ml de solução formalina para cada 100 ml de amostra). A análise taxonômica será realizada em microscópio óptico equipado com câmera fotográfica e câmara clara. Para a análise taxonômica das diatomáceas, parte do material perifítico será oxidado, segundo Battarbee *et al.* (2001), utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 35%) e ácido clorídrico (HCl 10%). As lâminas permanentes serão montadas utilizando Naphrax[®] (*IR* = 1,73) como meio de inclusão. Para a análise quantitativa, as amostras serão fixadas com solução de lugol acético 1%. A análise da densidade perifítica será realizada em microscópio invertido (segundo Utermöhl 1958), com tempo de sedimentação segundo Lund *et al.* (1958). Esta contagem será realizada em campos aleatórios (Uelinger 1964), e o limite de contagem será determinado pela curva de rarefação de espécies (quando nenhuma espécie nova for observada em pelo menos sete campos analisados) e pelo menos 400 indivíduos devem ser contados por amostras (Ferragut *et al.* 2013).

O peso seco e o peso seco livre de cinzas da comunidade perifítica serão determinados pelo método de pesagem e seguirão os procedimentos descritos em APHA (2005). A biomassa algal (representado pela clorofila-a, corrigida da feofitina) será determinada pelo método de extração em etanol 90% aquecido, sem maceração (Sartory & Grobelaar 1984) e os cálculos baseados em Golterman *et al.* (1978).

d) Macrófitas aquáticas

Para amostragem, as plantas devem ser coletadas utilizando um quadrado de 0,5 m² que deverão ser lançados três vezes aleatoriamente em cada um dos pontos dentro da malha amostral.

Os representantes da flora coletados são acompanhados de seus respectivos registros fotográficos e os dados referentes às coordenadas geográficas serão obtidos por meio do aparelho de GPS (Global Positioning System).

As espécies serão identificadas por meio do método comparativo de vouchers e tipos nomenclaturais, depositados nos principais herbários estaduais (BHCB, CVRD, MBML, VIC, VIES), nacionais (RB, SPF) e internacionais (K, MO, NY), acrônimos de acordo com Thiers (2016), além da utilização das bibliografias específicas.

Para a classificação das formas biológicas das macrófitas aquáticas é seguido o proposto por Irgang *et al.* (1984), sendo as espécies categorizadas como: Submersa fixa - enraizadas e crescem totalmente submersas na água; Submersa livre - permanecem flutuando submersas na água; Flutuante fixa - são enraizadas e com folhas flutuando na superfície da água; Flutuante livre -

permanecem flutuando com as raízes abaixo da superfície da água; e Anfíbia - plantas geralmente de margens; emergentes - enraizadas com folhas emergindo parcialmente.

4.4. ANEXO 4 - MONITORAMENTO DA PRAIA E ANTEPRAIA ADJACENTES A DESEMBOCADURA DO RIO DOCE

4.4.1. Monitoramento morfológico e sedimentológico

a) Morfologia dos sistemas praias

Os dados brutos obtidos no levantamento do perfil praias com o RTK são extraídos da controladora e exportados em arquivo ASCII. Os arquivos contêm as coordenadas geográficas (latitude e longitude), altimetria do terreno, além de dados complementares quanto a classificação da feição praias observada, inseridos no momento da aquisição. Informações auxiliares de incerteza horizontal e vertical (HSDV e VSDV) e de geometria de satélites (HDOP e VDOP) também são extraídas, com a finalidade de verificar a qualidade dos dados. Os dados são planilhados e processados em Excel, verificando a consistência dos valores de latitude, longitude e altimetria para a área de estudo. Por fim, são traçados os gráficos relativos ao perfil praias.

Os dados brutos do levantamento batimétrico são extraídos da Central de Controle do ecobatímetro por meio do programa SurveyLog. A partir deste programa os dados são exportados e apresentados nos formatos .BIN, ASCII e XYZ. Esses arquivos são processados no módulo Single Beam Process do programa Hypack, no qual são conferidos os valores de offsets da disposição dos equipamentos na embarcação e aplicada a correção da maré para o dia e a hora dos levantamentos. Como referência maregráfica são utilizados os dados de maré disponíveis no site da Marinha do Brasil, referentes ao Terminal de Barra do Riacho, o referencial mareográfico próximo à área de sondagem.

O processamento dos dados batimétricos prossegue com a remoção dos picos de sondagem (spikes), que consistem em dados espúrios que não refletem a profundidade real. Em função da alta frequência de aquisição dos dados (6 hz), estes são suavizados, a fim de compensar o movimento da embarcação durante a sondagem. Para isto, é utilizada a ferramenta smooth do programa de processamento.

O arquivo auxiliar (extensão .BIN) também é carregado no pacote *Single Beam Process*. Esse formato de arquivo permite a visualização dos ecogramas para interpretação dos padrões de fundo e verificação/validação dos valores batimétricos.

Os dados dos perfis expressos em distâncias e cotas, gerados pelo levantamento topobatimétrico dos perfis praias, são plotados em gráficos 2D por meio do programa *Excel* da *Microsoft*. Em função da dificuldade de navegação na zona de arrebentação é esperada uma lacuna de informação na antepraia mais rasa. Para preencher esta lacuna é realizada a interpolação dos dados de batimetria e topografia e os perfis são concetados para obtenção final do perfil topobatimétrico.

Para o ajuste do nivelamento deve ser adotado como datum vertical o nível médio do mar, referenciado ao Porto da Barra do Riacho. Para isso no momento do levantamento do perfil praias são registradas a hora e a posição do máximo recuo da onda na face praias, para posterior correção do nível da maré no momento da coleta.

b) Granulometria

A determinação da granulometria do sedimento arenoso é realizada por meio de peneiramento a seco. Inicialmente, as amostras são lavadas para a retirada do sal e colocadas na estufa para secar a uma temperatura média de 40 °C. Após a secagem, as amostras são quarteadas por meio do quarteador do tipo Jones. Na sequência, são pesados cerca de 50 g da amostra quarteada, que são postos no agitador de peneiras por 15 minutos. Para o peneiramento é utilizado um jogo de peneiras com malha de - 2 a 4 ϕ (4 a 0,063 mm) (Quadro 48).

Quadro 48. Especificação da malha das peneiras para o peneiramento a seco.

ϕ	mm
- 2,00	4,000
-1,75	3,360
-1,25	2,380
-1,00	2,000
- 0,50	1,410
0,00	1,000
0,50	0,710
1,00	0,500
1,50	0,350
2,00	0,250
2,50	1,770
3,00	0,125
3,25	0,105
3,75	0,074
ϕ	mm
4,00	0,063

Após o peneiramento, o sedimento retido em cada peneira é pesado e o peso destas frações é anotado na ficha mostrada na Figura 22. A partir destes valores são calculados os parâmetros estatísticos propostos Folk & Ward (1957) por meio do programa GRADISTAT (BLOTT & PYE, 2001).

Figura 22. Ficha de análise sedimentológica.

Monitoramento da praia e antepraia adjacentes a desembocadura do rio Doce



Ficha de Laboratório – Análise sedimentológica

Estação amostral: _____ Data da coleta: ___/___/___

Amostra: _____

Malha (USBS)	Abertura (mm)	Diâmetro (phi)	Peso retido (g)	Peso acumulado (g)	Peso retido acumulado (%)
5	4,000	- 2,00			
6	3,360	-1,75			
8	2,380	-1,25			
10	2,000	-1,00			
14	1,410	- 0,50			
18	1,000	0,00			
25	0,710	0,50			
35	0,500	1,00			
45	0,350	1,50			
60	0,250	2,00			
80	0,177	2,50			
120	0,125	3,00			
140	0,105	3,25			
200	0,074	3,75			
230	0,062	4,00			
Fundo	<0,062	<4,00			

Granulometria Peso inicial: _____ Peso final: _____

CaCO₃ Peso inicial: _____ Peso final: _____

Mineral pesado Peso inicial: _____ Peso final: _____

Processado por: _____ Data: ___/___/___

A determinação da granulometria das amostras que apresentam maior percentual de lama é realizada por meio de granulômetro a laser (Malvern). Inicialmente, as amostras são lavadas para a retirada do sal. Na sequência, é realizada a separação entre as frações areia e lama, por meio de peneiramento via úmida. Neste processo, as amostras são lavadas em uma peneira de 4 φ (0,063 mm). O sedimento mais fino, retido na peneira, é submetido à queima de matéria orgânica, a partir da adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O procedimento de queima é realizado com o auxílio da chapa aquecedora na capela de exaustão de gases. Após a queima, o sedimento é lavado três vezes para a retirada do H₂O₂ e o resíduo das duas primeiras lavagens deve ser descartado em recipiente próprio para o descarte de reagentes. Finalizados os procedimentos, 14 mL homogeneizados da amostra são postos no Malvern para a determinação granulométrica dos sedimentos finos.

c) Morfoscopia

Após o peneiramento, uma fração comum a todas as amostras é selecionada para análise morfoscópica dos grãos de quartzo. Esta análise é realizada através de observação em lupa binocular, segundo o método Ligus (1958). Através deste método, 100 grãos de quartzo são observados quanto ao seu grau de arredondamento e classificados entre as classes muito angulosa, angulosa, sub-angulosa, sub-arredondada, arredondada e bem arredondada (PETTJONH, 1957) Figura 23. Os resultados são apresentados em gráficos confeccionados a partir do programa *Excel* da *Microsoft*.

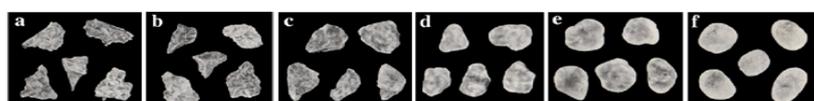
Figura 23. Ficha de análise morfoscópica.

Monitoramento da praia e antepraia adjacentes a desembocadura do rio Doce



Ficha de Laboratório – Morfoscopia

Estação amostral: _____ Data da coleta: ___/___/___
 Amostra: _____ Contar 100 grãos de quartzo



Diâmetro: _____ mm

Aspecto	Graus de arredondamento (Pettijonh, 1967)					
	Muito anguloso	Anguloso	Sub-Anguloso	Sub-Arredondado	Arredondado	Bem arredondado
Briho Natural						
Fosco						
Brilhante						
Picotado						
Sujo						
Total						

Diâmetro: _____ mm

Aspecto	Graus de arredondamento (Pettijonh, 1967)					
	Muito anguloso	Anguloso	Sub-Anguloso	Sub-Arredondado	Arredondado	Bem arredondado
Briho Natural						
Fosco						
Brilhante						
Picotado						
Sujo						
Total						

Processado por: _____ Data: ___/___/___

d) Teor e composição dos carbonatos

A determinação do teor de carbonato é realizada a partir de sua queima com ácido clorídrico 10% (HCl). Neste procedimento, são utilizados cerca de 20 g das amostras pré-processadas (lavadas, secas e quarteadas). A amostra é, então, colocada em um béquer, ao qual é adicionado o HCl até a completa dissolução dos carbonatos. O procedimento de queima é realizado em chapa aquecedora na capela de exaustão de gases.

Na sequência, as amostras são lavadas três vezes para a retirada do ácido e, então, colocadas para secar na estufa a uma temperatura em torno de 40 °C. O descarte das duas primeiras lavagens é realizado em um recipiente próprio para o descarte de reagentes. Após a secagem, as amostras são pesadas para quantificação do teor de carbonato. As amostras que apresentarem teor de carbonato superior a 30% devem ser analisadas visualmente quanto à composição deste material.

A identificação da natureza bioclástica dos sedimentos deve ser realizada por meio de observação em lupa binocular. São observados 200 grãos carbonáticos, em cada fração resultante do peneiramento, valor este considerado por Hubert (1962) mínimo e suficiente, para a condição em que os teores de sedimentos bioclásticos e não bioclásticos são conhecidos Figura 24.

Figura 24. Ficha de análise de composição carbonática.

Monitoramento da praia e antepraia adjacentes a desembocadura do rio Doce



Ficha de Laboratório – Composição carbonática

Estação amostral: _____ Data da coleta: ___/___/___

Amostra: _____ **Contar 200 grãos bioclásticos**

Diâmetro: _____ mm

Componentes	Quantidade	Total	Total (%)
Alga coralina incrustante			
Alga coralina articulada			
Alga Hamelida			
Molusco			
Ostracoide			
Briozóario			
Foraminífero			
Tubo de verme			
Equinoderma			
Crustáceo			
Coral			
Radiolário			
Outros			

Diâmetro: _____ mm

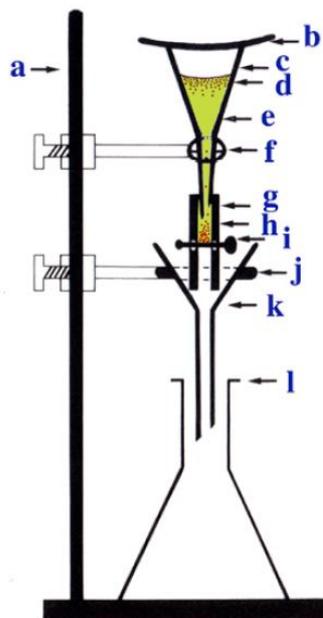
Componentes	Quantidade	Total	Total (%)
Alga coralina incrustante			
Alga coralina articulada			
Alga Hamelida			
Molusco			
Ostracoide			
Briozóario			
Foraminífero			
Tubo de verme			
Equinoderma			
Crustáceo			
Coral			
Radiolário			
Outros			

Processado por: _____ Data: ___/___/___

e) Teor e identificação de minerais pesados

A determinação do teor de minerais pesados é realizada por meio do método gravitacional utilizando bromofórmio. Após a dissolução do carbonato de cálcio, as amostras são postas no funil de separação contendo bromofórmio e agitadas com um bastão de vidro (Figura 25).

Figura 25. Estrutura para separação de minerais pesados pelo método gravitacional. a) estrutura de apoio; b) vidro relógio; c) funil de separação; d) minerais leves; e) líquido de separação (bromofórmio); f) suporte do funil; g) tubo de borracha; h) minerais pesados; i) pinça que permite ou não a passagem do líquido e da fração pesada; j) suporte do funil de filtração; k) funil de filtração; l) frasco de recepção.



Decorridos alguns minutos, os minerais pesados se depositam no tubo de borracha associado ao funil (Figura 25). Com a pinça que prende a borracha é aberta uma pequena passagem para que os minerais pesados sejam transferidos para o funil com o filtro de papel (Figura 25). Os minerais retidos neste filtro são lavados com álcool e o resíduo da lavagem é descartado em um recipiente próprio para o descarte de reagentes. A amostra é, então, colocada na estufa para secar a uma temperatura de 40 °C. Após a secagem, os sedimentos são pesados para a quantificação do teor de minerais pesados.

A identificação dos minerais pesados é realizada por meio de observação em lupa binocular. Neste sentido, são observados 300 grãos de minerais pesados em cada fração resultante do peneiramento a seco (GaleHouse, 1971). As amostras que possuírem um número inferior a este, devem ter todos os minerais pesados presentes identificados. Inicialmente, os minerais pesados devem ser diferenciados entre transparentes e opacos e, então, aqueles tidos como transparentes devem ser identificados quanto à espécie (Figura 26).

Figura 26. Ficha de análise de minerais pesados.

Monitoramento da praia e antepraia adjacentes a desembocadura do rio Doce



Ficha de Laboratório – Minerais pesados

Estação amostral: _____ Data da coleta: ___/___/___

Amostra: _____ **Contar 300 grãos minerais pesados**

Diâmetro: _____ mm

Componentes	Quantidade	Total	Total (%)
Sillimanita			
Granada			
Turmalina			
Rutilo			
Opacos			
Fragmentos de rochas oxidados			
Outros			
Total			

Diâmetro: _____ mm

Componentes	Quantidade	Total	Total (%)
Sillimanita			
Granada			
Turmalina			
Rutilo			
Opacos			
Fragmentos de rochas oxidados			
Outros			
Total			

Diâmetro: _____ mm

Componentes	Quantidade	Total	Total (%)
Sillimanita			
Granada			
Turmalina			
Rutilo			
Opacos			
Fragmentos de rochas oxidados			
Outros			
Total			

Processado por: _____ Data: ___/___/___

f) Análise dos dados morfológicos e sedimentológicos

A partir do monitoramento morfológico e sedimentológico é possível avaliar a variação topográfica das praias em decorrência do acréscimo de sedimentos finos no sistema praial e discutir a resiliência deste sistema em função da incorporação da fração lamosa. Nesse sentido, a partir da granulometria média do grão (D_{50}), os modelos de Dean (1977) e de Bernabeu et al. (2003) devem ser aplicados a

área de estudo, conforme a tipologia das praias. Esses modelos fornecem o perfil praiado de equilíbrio teórico e, ao serem comparados aos perfis levantados em campo, permitem avaliar a resiliência da praia à nova condição sedimentológica.

Os dados morfológicos devem ser ainda utilizados para o cálculo do *run up* e do potencial de inundação, (RUGGIERO et al., 2001; STOCKDON et al., 2006; MATHER et al., 2011) que permitem avaliar a vulnerabilidade das praias quanto à possibilidade de inundação e contaminação das áreas de proteção ambiental, que incluem áreas de desova de tartarugas. Neste contexto, os dados de composição dos sedimentos permitem ainda avaliar a incorporação atípica de minerais pesados na área de estudo, a partir da comparação dos resultados com os dados pretéritos conhecidos da região

4.4.2. Monitoramento da qualidade química das areias

a) Preparo das amostras de sedimento

No laboratório, secar as amostras em estufa a 60 °C até peso constante. Após a secagem, levar as amostras para o dessecador até que se atinja a temperatura ambiente. Após a etapa de secagem, realizar o quarteamento das amostras de sedimento para obtenção de uma fração representativa e homogênea. Peneirar as amostras de sedimento em peneiras de nylon de 10 mesh e armazenar a fração inferior a 1mm de tamanho de partícula em sacos plásticos, que ficarão acondicionados em dessecador até o momento da pesagem da amostra para o procedimento de extração ou decomposição.

As amostras deverão ser analisadas visando obter a concentração de elementos traço biodisponível (procedimento de extração) e *pseudo total* (procedimento de decomposição).

OBS: Se necessário, conservar as amostras a 4 °C quando forem analisadas dentro de 1 semana, caso contrário armazenar a -20 °C.

- Extração da fração biodisponível

Para extração da fração biodisponível dos elementos traço utilizar a norma ASTM D3974-09 que se baseia na aplicação da extração ácida com HCl 5% (v/v) obtendo-se a fração lixiviável (biodisponível).

Pesar aproximadamente 5g em peso seco da amostra do sedimento fino (\emptyset partículas < 1mm) em Erlenmeyer de polipropileno seguindo-se com a adição de 50 mL de uma solução de HCl 5% (v/v) e agitação mecânica por 16h (*overnight*).

- Filtrar a solução utilizando funil de polipropileno e filtro de papel quantitativo de 12,5 mm e transferir quantitativamente para um tubo de polipropileno.
- Preparar brancos analíticos seguindo o mesmo procedimento, porém sem a adição da amostra.

Calcular a concentração dos elementos nas amostras de acordo com a Equação 8.

$$C = \frac{(Q - S)V}{U}$$

Equação 8

Onde:

Q = concentração do elemento no extrato ácido, µg/mL

S = concentração do elemento no branco, µg/mL

V = volume do extrato ácido (aproximadamente 50 mL)

U = massa da amostra seca

C = concentração do elemento na amostra original, µg/g

- Decomposição pseudo total

➤ Para o procedimento de decomposição *pseudo total* das amostras de sedimento utilizar o método normalizado EPA 3051A.

Pesar aproximadamente 250 mg em peso seco da amostra de sedimento fino (\emptyset partículas < 1mm) em frasco de Teflon próprio para o uso no forno micro-ondas, e adicionar 10 mL de HNO₃ concentrado ou alternativamente 9 mL de HNO₃ concentrado e 3 mL de HCl concentrado. Após a adição do(s) ácido(s), deixar as amostras em repouso por aproximadamente 15 minutos dentro da capela (etapa de pré-digestão). Ao final desse período, fechar adequadamente os frascos e submeter a mistura à decomposição assistida por radiação micro-ondas. Utilizar um programa de aquecimento que consiste em uma rampa de aquecimento de 5,5 ± 0,25 min até atingir a temperatura de 175 ± 5°C e uma permanência de 4,5 min a temperatura de 175 ± 5°C; utilizar um tempo de resfriamento de 10 min. Após esse período retirar o rotor do micro-ondas e mantê-lo por um período de aproximadamente 30:00 min dentro da capela para posterior abertura dos tubos. Ao final, filtrar a solução utilizando funil de polipropileno e filtro de papel quantitativo de 12,5 mm e transferir quantitativamente para um tubo de polipropileno, avolumando para 15 mL ou 50 mL (EPA 2007) com água deionizada.

b) Determinação de elementos traço nas frações biodisponível e pseudo total das amostras de sedimento

A escolha da técnica espectrométrica a ser utilizada na determinação dos elementos traço vai depender da concentração dos analitos nas amostras de sedimento e na capacidade de detecção das técnicas analíticas. Para os elementos que se encontram a nível ultra-traço (ng L⁻¹ a µg L⁻¹) a técnica empregada será a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Para os elementos que se encontram a nível traço (µg L⁻¹ a mg L⁻¹) a técnica mais apropriada será a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para a determinação dos elementos em concentrações mais altas, a espectrometria de absorção atômica em

chama (F AAS) será empregada. A determinação de mercúrio será realizada por um equipamento específico para tal fim, o analisador de mercúrio DMA-80.

- Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

As condições operacionais do ICP-MS devem ser otimizadas de maneira a maximizar as intensidades de Mg (> 6000 cps) , In (> 30000 cps) e U (> 20000 cps) e minimizar a incidência de íons dupla carga (Ce²⁺) e óxidos (CeO⁺) não podendo ultrapassar o limite de 3%.

Para corrigir eventuais interferências não espectrais ocasionadas pela matriz da amostra, o uso de padrão interno é altamente recomendado. Para tanto, devem ser utilizados elementos para esse fim, tais como Índio (In), Ródio (Rh) ou Bismuto (Bi) sendo a concentração do padrão interno estimada em função da concentração dos analitos na amostra.

OBS: A intensidade do padrão interno deve ser da mesma ordem de grandeza da intensidade do analito na solução que será analisada.

A exatidão do método deve ser verificada mediante emprego de um material de referência ou pela fortificação de uma amostra controle.

A cada cinco amostras analisadas deve ser analisada uma amostra controle para avaliação da influência do drift instrumental sobre os resultados obtidos.

OBS: A utilização da solução para correção do drift instrumental deve ser criticamente avaliada pelo analista.

A faixa linear de trabalho da curva analítica deve ser definida observando a concentração dos analitos na amostra, buscando sempre que possível, manter a concentração dos analitos na solução de leitura no centroide da curva analítica.

Todas as soluções analíticas (curva analítica, amostras, brancos, materiais de referência, etc) devem ser preparadas em ácido nítrico (HNO₃) 2% (v/v).

- Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)

As condições operacionais do ICP OES devem ser otimizadas de maneira a maximizar a razão Mg(II)/ Mg (I) sendo essa razão uma medida da robustez do plasma. Recomenda-se utilizar as condições operacionais do ICP OES de tal maneira que a razão intensidades de Mg(II)/ Mg (I) seja superior a 10.

Para corrigir eventuais interferências não espectrais ocasionadas pela matriz da amostra, o uso de padrão interno é altamente recomendado. Para tanto, ítrio (Y) ou escândio (Sc) deve ser utilizado para esse fim, sendo a concentração do padrão interno estimada em função da concentração dos analitos na amostra.

OBS: A intensidade do padrão interno deve ser da mesma ordem de grandeza da intensidade do analito na solução que será analisada.

A exatidão do método deve ser verificada mediante emprego de um material de referência ou pela fortificação de uma amostra controle.

A cada cinco amostras analisadas deve ser analisada uma amostra controle para avaliação da influência do *drift* instrumental sobre os resultados obtidos.

OBS: A utilização da solução para correção do *drift* instrumental deve ser criticamente avaliada pelo analista.

A faixa linear de trabalho da curva analítica deve ser definida observando a concentração dos analitos na amostra, buscando sempre que possível, manter a concentração dos analitos na solução de leitura no centroide da curva analítica.

Todas as soluções analíticas (curva analítica, amostras, brancos, materiais de referência, etc) devem ser preparadas em ácido nítrico (HNO₃) 2% (v/v) ou em ácido clorídrico (HCl) 2%.

- Espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)

As condições operacionais do F AAS (AAS ZEE nit 700 BU, Analytik Jena), tais como o comprimento de onda, corrente da lâmpada de cátodo oco e a fenda espectral do monocromador devem ser escolhidas baseadas nas recomendações do fabricante (*cookbook*). Otimizar a altura do queimador e a vazão de gás acetileno ou óxido nítrico utilizando a otimização automática disponível no software do equipamento.

A exatidão do método deve ser verificada mediante emprego de um material de referência ou pela fortificação de uma amostra controle.

A cada cinco amostras analisadas deve ser analisada uma amostra controle para avaliação da influência do *drift* instrumental sobre os resultados obtidos.

OBS: A utilização da solução para correção do *drift* instrumental deve ser criticamente avaliada pelo analista.

A faixa linear de trabalho da curva analítica deve ser definida observando a concentração dos analitos na amostra, buscando sempre que possível, manter a concentração dos analitos na solução de leitura no centroide da curva analítica.

Todas as soluções analíticas (curva analítica, amostras, brancos, materiais de referência, etc) devem ser preparadas em ácido nítrico (HNO₃) 2% (v/v) ou em ácido clorídrico (HCl) 2%.

4.4.3. Monitoramento da fauna bentônica

Todas as amostras de sedimento para as análises da fauna bentônica (meio e macrofauna) são encaminhadas ao Laboratório de Ecossistemas Marinhos do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Em laboratório, a macrofauna é triada manualmente e os organismos encontrados são identificados via microscópio estereoscópico e óptico, com auxílio de bibliografia especializada.

A meiofauna é extraída do sedimento por elutriação, sendo o sobrenadante passado em peneira de 0,063mm de abertura e triagem manual. Posteriormente, o material é identificado ao nível de grandes grupos em placas de Dollfus compostas por 200 quadrados utilizando, para tal, um microscópio estereoscópico. Para o estudo taxonômico de Nematoda, são retirados 100 organismos de cada amostra.

A diafanização dos animais é efetuada através da técnica descrita por De Grisse (1969), que consiste em introduzi-los sequencialmente em três soluções: Solução 1: 99% de Formol a 4% mais 1% de Glicerina (12 horas de repouso em dessecador); Solução 2: 95% de Etanol mais 5% de Glicerina (8 horas em estufa); Solução 3: 50% de Etanol mais 50% de Glicerina. Aproximadamente dez animais são destinados à montagem de cada lâmina permanente, previamente preparada com um círculo de parafina, contendo uma gota de glicerina. A lâmina é fechada com uma lamínula, sendo o conjunto levado ao aquecimento até a parafina derreter.

As amostras de poliquetas intersticiais, são colocadas sob refrigeração, e parte de cada uma das amostras são enviadas ao colaborador especialista Dr. Maikon Di Domenico (UFPR) para identificação e realização de fotografias em MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura), para melhor visualização das estruturas.

Demais grupos de organismos como Amphipoda, Isopoda, Tanaidacea, Echinodermata, Insecta e outros, são enviados a diversos especialistas em diferentes universidades do país para identificação.

a) Coleção

Os indivíduos identificados (macro e meiofauna) são registrados na coleção CZNC na divisão de bentos. Organismos de macrofauna são colocados em frascos de vidro, fixados em álcool 70-90%, registrados, numerados e etiquetados.

Os representantes da meiofauna são condicionados em frascos tipo flaconete ou eppendorfs, fixados em formol, registrados, numerados e etiquetados. Apenas os representantes do filo Nematoda estarão em lâminas permanentes para manutenção na coleção, conforme a metodologia supracitada.

b) Análise dos dados

Para auxiliar na interpretação dos dados, realiza-se cálculos de índices biológicos e análises estatísticas. São calculados os índices de densidade total, riqueza taxonômica, diversidade e

densidade dos organismos mais abundantes, além da variação da fauna bentônica entre as estações amostrais.

c) Análise integrada dos dados

A partir da análise integrada dos dados morfológicos, sedimentológicos, geoquímicos e bentônicos deve ser realizado o diagnóstico de contaminação dos sistemas praias adjacentes à desembocadura do rio Doce e a avaliação da resiliência desses sistemas para neutralizar a ação dos contaminantes ao longo do tempo nos sedimentos e na fauna bentônica.

4.5. ANEXO 5 - ALTERAÇÕES ECOLÓGICA NA DINÂMICA DOS MANGUEZAIS E VEGETAÇÃO DE RESTINGA SOB INFLUÊNCIA DOS SEDIMENTOS PROVENIENTES DO RIO DOCE

4.5.1. Manguezal

a) Monitoramento da fitossociologia da Vegetação

De posse dos dados levantados em campo, serão calculados para cada parcela de amostragem, os seguintes parâmetros estruturais: a área basal, a densidade de troncos, a altura média do bosque, o DAP (diâmetro à altura do peito, médio), além da dominância em área basal e a densidade de jovens, bem como, composição, abundância e índice de importância da espécie em cada parcela

A seguir serão apresentadas a metodologia de tratamento de dados:

- Área Basal

A área basal (g) representa a contribuição de madeira em cada floresta, ou seja, é a área de troncos por área de terreno. Esta será dividida por espécies, classes de DAP e pela condição da árvore (viva ou morta). O diâmetro à altura do peito (DAP) pode ser facilmente convertido para área basal pela seguinte relação:

$$g = 0,00007854 \times (\text{DAP})^2,$$

sendo g em m² e dap em cm.

A soma das áreas basais de todos os troncos por unidade de área equivale à área basal da floresta, e é geralmente expressa em m² de madeira por hectare (ha). Esta medida serve como um excelente índice do grau de desenvolvimento adquirido pela floresta, uma vez em monitoramento permite avaliar incremento ou não de biomassa.

- Densidade

A densidade é o número de troncos por unidade de área, expresso em troncos/hectare. Em similaridade com a área basal esta medida será dividida por espécies, classes de DAP e condição da árvore (viva ou morta).

A densidade da floresta é função de sua idade e amadurecimento, de modo que florestas mais jovens possuem maior número de troncos por unidade de área, observa-se então que estes deverão ter diâmetros menores se comparados com florestas mais desenvolvidas.

- Altura Média

Altura média e seu desvio padrão serão obtidos pela média aritmética dos dados de todas as árvores vivas encontradas em cada parcela e servirá como um dos parâmetros para o entendimento do desenvolvimento estrutural das florestas de mangue analisadas. Além desta forma de avaliar a altura média, serão obtidos também os dados dos três indivíduos mais altos na parcela transformados em dado médio como uma forma de estimar a altura do dossel.

- Dominância Relativa e Densidade relativa

Para avaliação destes parâmetros que caracterizam a comunidade, a metodologia empregada para a distribuição de frequência de troncos é aquela adotada por Cintron E Schaeffer-Novelli (1984) onde as classes de diâmetro não são variáveis, mas correspondem a classificação de jovem (diâmetros $\leq 2,5$ cm), intermediários ($\geq 2,5$ cm e $\leq 10,0$ cm) e maduros ($\geq 10,0$ cm). Dominância relativa é um parâmetro quantitativo que é útil para descrever a comunidade arbórea. Entretanto este pode ser usado para interpretar a importância da contribuição de cada espécie, em cada classe de tamanho, em termos de densidade e contribuição em área basal (dominância). O cálculo é feito da seguinte forma:

$$\text{Dominância (área basal)} = \frac{\text{área basal de uma classe}}{\text{área basal total}} \times 100$$

Densidade Relativa (nº de troncos de uma classe) – D.R.,

$$\text{D.R.} = \frac{\text{nº de troncos de uma classe}}{\text{nº total de troncos}} \times 100$$

- Diâmetro Médio (DAP)

Diâmetro médio é definido simplesmente como o diâmetro do tronco da área basal média. Isto não significa uma verdade aritmética para o diâmetro das árvores, mas é útil para descrever medidas e pode ser usado para comparação entre florestas e para correlação com outras estruturas florestais.

A média dos diâmetros (DAP) é sempre menor que o diâmetro da árvore basal média (DAP). O DAP é obtido com os dados da área basal viva por meio da seguinte fórmula:

$$\text{DAP} = [(g) \cdot 12732,39/n]^{1/2},$$

onde n = número de troncos por hectare e g = área basal por hectare.

- Densidade de Jovens na parcela

A densidade de jovens na parcela será obtida por meio do número absoluto de indivíduos por unidade de área. Os dados serão referenciados pelas espécies em cada parcela e servirá como um dos parâmetros para o entendimento da capacidade de resiliência da floresta, além de indicar o estágio de saúde das florestas de mangue relacionado as condições de produção e germinação de novos indivíduos. No caso de plântulas, quando houver uma densidade muito elevada, serão contados os indivíduos por quadrats e extrapolados para a área total da parcela.

Além disto, os dados obtidos serão analisados para avaliar a composição da comunidade, biomassa, abundância e índice de importância da espécie em cada parcela. Estes parâmetros serão monitorados semestralmente e tratados estatisticamente, de acordo com análises não paramétricas, para avaliar e comparar se estão acontecendo modificações significativas na estrutura da comunidade (Zar, 1998).

b) Estrutura das halófitas do Rio Doce

A estrutura das parcelas das halófitas presentes no foz do Rio Doce serão avaliadas dentro do mesmo procedimento metodológico, entretanto, quando não for possível distinguir se os troncos pertencem a indivíduos distintos, principalmente para *Talipariti pernambucensis* (antiga *Hibiscus*), os diâmetros serão tratados como sendo cada tronco um indivíduo, sendo inclusive obtidos na mesma altura para as árvores de mangue. No caso de ocorrer exemplares de *Acrostichum* não haverá obtenção de diâmetro. As alturas serão observadas por indivíduo. Não haverá contagem de plântulas.

c) Monitoramento da Produtividade Primária

- Extração e separação dos pigmentos fotossintéticos e derivados esverdeados

O procedimento de extração será realizado de forma que os efeitos da luz, da temperatura e da ação enzimática sobre a degradação da clorofila sejam minimizados. Para isto, todas as vidrarias contendo as amostras serão protegidas da luz e os solventes de extração serão utilizados gelados. O tempo de extração deverá ser mantido ao seu mínimo possível, diminuindo, assim, a possibilidade de degradação dos pigmentos analisados.

A extração dos pigmentos será feita de acordo com o método descrito por Sinnecker et al. (2005). Cinco (5) gramas de material vegetal (folha) serão pesados, homogeneizados em 30 mL de acetona P.A. 80% e filtrado sob vácuo. O resíduo será imerso em acetona P.A. 80% por mais duas vezes, para garantir completa extração. Em seguida, a clorofila e derivados presentes na solução de acetona serão transferidos para 100 mL de éter de petróleo P.A. em funil de separação. A solução será lavada com água destilada para remoção de impurezas hidrossolúveis, e seca com sulfato de sódio P.A. anidro. Sem seguida, a solução será concentrada em rotoevaporador e o material obtido será redissolvido em acetona (grau HPLC) e completado o volume para cinco mililitros. Uma alíquota dessa solução será filtrada por uma membrana de PTFE de 0,22 μm e encaminhada imediatamente para a análise de HPLC, com injeção de 50 μL . A separação dos pigmentos (SINNECKER et al. 2005) será realizada por cromatografia líquida de alta pressão em equipamento Waters (Alliance HPLC Systems,

UK), equipado com um sistema de três bombas, detector de arranjo de diodos UV/Vis, coluna Symmetry C18 Column (100Å, 3,5 µm, 4,6 mm x 75 mm, 1/pkg) e uma coluna de guarda (3,5 mm x 4 mm). A fase móvel será constituída de (A) metanol, (B) acetato de amônio 1M e (C) acetona, aplicando o seguinte gradiente: 0 min (80:20:0 v/v/v), 15 min (80:0:20), 17,5 min (80:0:20), 30 min (0:0:100), 34 min (80:20:0), 40 min (80:20:0). Esse gradiente deverá ser eficiente para a separação dos principais pigmentos verdes, polares e não-polares, em uma mesma coluna de fase reversa, sem necessidade de uma etapa de pré-fracionamento em coluna aberta. O acetato de amônio é necessário para manter os compostos polares parcialmente dissociados, permitindo assim a sua eluição (MANGOS & BERGER, 1997).

A mudança de concentração entre acetona e metanol permite a separação das xantofilas e clorofilas dos feoforbídeos e clorofilídeos. A acetona é necessária para eluir as feofitinas, que são os pigmentos mais apolares. As substâncias serão analisadas a 410, 432 e 459 nm e a identificação e quantificação serão feitas por comparação dos espectros e dos tempos de retenção com padrões (MANGOS & BERGER, 1997).

Todos os reagentes usados para a análise por HPLC serão de grau HPLC e previamente filtrados por membranas adequadas de 0,45 µm (PTFE para acetona e PVDF para metanol e acetato de amônio). No preparo do acetato de amônio 1M foi utilizada água purificada (MilliQ). Antes de cada corrida em HPLC, os solventes foram desgaseificados durante dez minutos, com banho ultrassônico.

Os pigmentos isolados serão identificados comparando seus espectros de absorbância e tempos de retenção com os de padrões de clorofila *a* (Sigma C5753, Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA) e clorofila *b* (Sigma C5878). Esses padrões são provenientes do espinafre e tem um grau de pureza de 99,99%.

Todos os pigmentos serão identificados de acordo com seus respectivos comportamentos cromatográficos, caracterizados pelo tempo de retenção e pelo espectro de absorção UV/Vis, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 700 nm. O perfil espectral de cada substância encontrada será sobreposto ao do padrão referencial correspondente, permitindo assim a identificação dos pigmentos.

As curvas padrão para clorofila *a* e *b* serão preparadas em triplicata entre 0,001-0,04 mg/mL e 0,001-0,015 mg/mL, respectivamente. Com as concentrações aplicadas e as áreas obtidas para cada pico, será realizada uma análise de regressão linear, obtendo-se assim as curvas padrão. As áreas dos picos encontrados nos extratos das amostras serão interpoladas nas curvas padrão para quantificar a concentração dos pigmentos existentes nas amostras analisadas. Em seguida, o teor do pigmento na amostra será calculado levando-se em consideração todas as diluições feitas ao longo do procedimento. A unidade final dos cálculos será dada em mg/kg em base seca.

- Índice de Área Foliar

O índice de área foliar (IAF) será medido para determinar a cobertura do dossel ao longo do período de monitoramento, com medidas bimensais. O tratamento estatístico será similar ao descrito para as

variáveis de fotossíntese. O equipamento será utilizado de forma a se traçar caminhos em zig zag pelo bosque para se obter a cobertura do dossel, realizando-se 10 réplicas por parcelas. No momento da obtenção dos dados de fluorescência e fotossíntese, o equipamento será utilizado para avaliar a cobertura do dossel sobre a unidade amostral selecionada. Vai contribuir para estimar a irradiância que chega através do dossel.

d) Diagnóstico Sobre a Fauna do Manguezal

- Parâmetros populacionais de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi*

Os dados serão analisados com estatística paramétrica, sendo o pressuposto da homogeneidade de variâncias testado previamente com o Teste “C” de Cochran e a normalidade avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando séries de dados se mostrarem não normais elas terão seus números amostrais balanceados e continuarão sendo utilizados testes paramétricos, já que estes são robustos o suficiente para lidar com a fuga deste pressuposto (UNDERWOOD 1997). No caso da homogeneidade de variâncias, quando este pressuposto não for atendido, os dados serão transformados em raiz quadrada e, em casos extremos, o nível de confiança será elevado de 95% para até 99,99% para diminuir a probabilidade de “erro tipo 1” (afirmar que existe diferença estatística quando, na verdade, não existe). O teste paramétrico utilizado será a Análise de Variância (ANOVA), conduzida separadamente para as variáveis dependentes “densidade populacional” (nº de indivíduos / m²), “densidade comercial” (nº de indivíduos com largura de carapaça igual ou maior que 6 cm / m²) e “largura de carapaça” (cm). As ANOVAS serão bifatoriais, considerando-se como fatores o “mês de amostragem” e a “área de amostragem”. O teste de comparações múltiplas (post-hoc), utilizado para identificar quais médias das variáveis dependentes diferem entre si, será o Teste de Tukey HSD (com nível de confiança de 95% ou até 99,99% no caso de amostras com variâncias heterogêneas).

- Fecundidade de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi*

Em laboratório, as fêmeas serão lavadas para retirar o excesso de sedimento para, em seguida, ser avaliados dados morfológicos. Em balança de alta precisão (com precisão de 0,001g) será obtido o peso de cada exemplar com seus ovos. Posteriormente, essas fêmeas serão preservadas em solução produzida no próprio laboratório contendo 40% de água destilada e 60% de formol. Após estes processos, acontecerão a raspagem da massa ovígera presa nos pleópodes de cada fêmea.

Da massa ovígera serão analisadas informações como 1) peso em gramas (g) em balança de alta precisão, para posterior comparação com a largura do cefalotórax; 2) peso em volume (g/ml) utilizando vidrarias volumétricas e, proveta com capacidade de 100 ml como parâmetro; e 3) contagem, por unidade, da massa ovígera de cada fêmea.

Para a obtenção do número de indivíduos por massa ovígera, serão adotados os seguintes procedimentos: De cada fêmea serão retirados uma subamostra de 2,5g/ml de massa ovígera determinada com ajuda de um eppendorf, isto é, até seu preenchimento total. Após etapa de determinação do volume e quantificação, a massa ovígera será colocada em vidro relógio para serem

separados com auxílio de duas pinças, pois as mesmas são encontradas presas por filamentos em formato de cacho de uva.

A separação e análise do número de ovos por massa ovígera serão feitos utilizando o estereoscópio óptico. E, posteriormente, fotografados com emprego de câmera clara que permitirá a aquisição de imagens fotográficas. A escala das fotografias será determinada pelo programa de aquisição de imagens 10x, instalado em computador acoplado ao estereoscópio sendo seu ajuste feito de acordo com o aumento empregado pela objetiva selecionada para a visualização da imagem no estereoscópio. De cada fêmea analisada, serão retiradas uma alíquota de 2,5 g/ml de massa ovígera que gerarão 40 seções de fotografias.

Após a aquisição das imagens digitais, esses serão transferida para o programa Paint (Microsoft®) para facilitar a contagem da amostra. Para cada fêmea serão obtidas 40 imagens que terão o total de seus ovos contados. E posteriormente, o número de ovos serão extrapolados para a determinação do número total de ovos por fêmea. Todos exemplares serão devidamente etiquetados contendo suas informações e armazenados em frascos e conservados no freezer.

As análises de dados para a fecundidade serão estimadas por meio da expressão ($F = N \times (P/PS)$) proposta por Ogawa et al. (1976), onde: F = fecundidade individual; N = número de ovos da subamostra; P = peso total da massa de ovos; e PS = peso da subamostra. A correlação entre peso da massa ovígera com largura do cefalotórax será submetida a análise de regressão linear.

- Riqueza de espécies de Brachyura (Decapoda)

Em laboratório, os espécimes serão lavados e fixados em álcool 70%, e a classificação taxonômica será realizada com microscópio estereoscópio óptico (Nikon, LeicaM80) e, posteriormente, fotografados com emprego de câmera clara (Leica EC3) que permitirá a aquisição de imagens fotográficas. Os espécimes serão identificados ao menor nível taxonômico possível por bibliografia especializada, Melo (1996) e Crane (1975), e ajustadas às classificações mais recentes de gênero segundo Shish (2016).

Serão analisados para esta pesquisa dados quantitativos, ecológicos e análises multivariadas.

Será feita a Abundância Total (AT), Relativa (AR) e Frequência de ocorrência (FR) para as análises quantitativas, Diversidade de Shannon (H')(variedade de espécies), Equitabilidade de Pielou (J')(distribuição de indivíduos entre as espécies), Riqueza de Margalef (D)(abundância numérica em determinada área geográfica) e Dominância de Simpson ($1-\lambda$)(que trata da probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie) para as análises ecológicas. As multivariadas serão aplicadas de forma que melhor se ajustem aos dados obtidos.

e) Diagnóstico de Contaminação da Vegetação do Manguezal por Metais

Em todas as amostras de sedimento serão analisados os seguintes metais: Arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn),

assim como contarão com análises de matéria orgânica total (MOT), remoção do sal, granulometria e teor de carbonato de cálcio (CaCO_3).

- Metals

As amostras serão secas em estufa a 60°C por 3 a 4 dias, levemente moídas em um almofariz de ágata para homogeneização, peneiradas para passar $< 63\ \mu\text{m}$ (metais são mais frequentemente associados com grãos pequenos), e preparado para análise.

A solubilização dos metais contidos nas amostras de sedimentos será feita por lixiviação ácida. Em balança analítica pesar cerca de 1 g do sedimento moído. De cada amostra retirar três replicatas. Ao Erlenmeyer contendo o sedimento pesado adicionar 30 mL de solução de HNO_3 $0,3\ \text{mol L}^{-1}$. Em seguida, fechar os frascos e colocar em um agitador horizontal por 1 hora a uma rotação de 85 rpm e a temperatura aproximada de 29°C . Em seguida filtrar a solução em papel coador. O resíduo será lavado com água destilada e deionizada. Recolher o filtrado em balão volumétrico de 100 mL. O volume da solução filtrada será completado com água até 100 mL. Após este tratamento, transferir as soluções para frascos de polietileno, previamente lavados, etiquetadas e reservadas.

Os metais pesados das amostras de sedimentos serão determinados por espectrometria de absorção atômica em chama de ar/acetileno, pelo método direto e corretor de fundo. Cada metal será medido segundo suas curvas de calibração com os seus respectivos limites de detecção.

- Análise do teor de matéria orgânica total (MOT) - Método da Mufla

Separar cerca de 2 g de sedimento bruto (aproximadamente 1 colher de chá) em um Becker limpo e levar à estufa para secar a 105°C por 24h, visando eliminar toda a água presente nos resíduos, como a higroscópica, a capilar ou de cristalização. Terminadas as 24h, checar visualmente se o sedimento se encontra seco. Após, pesar o sedimento seco em balança de precisão e colocar o sedimento pesado em um cadinho de porcelana (limpo e previamente pesado) para queimar em Mufla a 450°C por 4h. Posteriormente, colocar o cadinho de porcelana contendo o sedimento para esfriar em um dessecador por, no mínimo, 1h. Após, pesar o cadinho de porcelana contendo o sedimento em uma balança de precisão.

A massa de matéria orgânica total será o peso do sedimento antes de ser levado à Mufla subtraído do peso do cadinho de porcelana e do sedimento após queima ($\text{MOT} = \text{sedimento pré-queima} - \text{sedimento pós-queima} - \text{cadinho de porcelana}$). O teor será a conversão deste valor em porcentagem.

- Remoção de sal

Para a retirada do sal, as amostras brutas serão lavadas com água da torneira, separadamente, 3 vezes, como segue: colocar o sedimento em um Becker de 1L e preencher com água até a marca de 1L. Agitar levemente e deixar descansando para decantação. Após completa deposição de todo o

sedimento em suspensão, drenar (delicadamente) a água com uma mangueira. Repetir o procedimento 3 vezes.

Após a remoção do sal, 2/3 da amostra ainda úmida serão destinados à análise granulométrica e 1/3 à análise do teor de carbonato.

- Análise Granulométrica

Primeiramente é feita a separação das frações fina (silte + argila) e grossa (areia + cascalho) da amostra. Esta separação será feita via úmida em 2 peneiras de 0.63 μm sobrepostas. Posicionar as peneiras (diâmetro da peneira de acordo com o volume da amostra - 8x2 polegadas ou 3x2 polegadas) sobre um Becker de 1L (ou peneira, dependendo do volume da amostra). Colocar o sedimento ainda úmido dentro da peneira superior (se necessário, pouco a pouco). Lavar, pouco a pouco, com água da torneira por meio de uma pisseta com o auxílio das mãos (delicadamente). Terminada a lavagem, o sedimento retido na peneira (fração grossa) será transferido para outro Becker previamente pesado.

O Becker contendo a fração fina será deixado em repouso até completa deposição do sedimento em suspensão. Após este procedimento, o excesso de água será drenado (delicadamente) com uma mangueira e seguir para remoção da matéria orgânica por queima com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%.

O Becker contendo a fração grossa (após a água ser drenada) será levado à estufa a 40°C para secagem da amostra. Após secagem, o sedimento será pesado e seguirá para o fracionamento via seca.

Na fração fina será realizada a *Queima da matéria orgânica com H_2O_2* : em uma capela de exaustão de gases (ligada), o Becker contendo a fração fina será posicionado sobre uma chapa aquecedora (à 70°C). Será adicionado delicadamente e aos poucos (reação forte) o H_2O_2 à amostra com o auxílio de uma pisseta até que a reação termine (O término da reação se dará após cessar o borbulhamento).

Após adição do H_2O_2 , deixa-se o Becker sobre a chapa aquecedora ligada por, no mínimo, 6h. Terminadas as 6h, checar se o sedimento ainda irá reagir (borbulhar) com a adição de mais H_2O_2 . O procedimento de queima deve continuar até que não haja mais reação (borbulhamento) com a adição de mais H_2O_2 ao sedimento. Terminada a queima, a amostra será lavada 3 vezes no próprio Becker seguindo o mesmo procedimento descrito para a remoção de sal (lavagem seguida de decantação).

Terminada a lavagem do H_2O_2 , a água será drenada (delicadamente) com uma mangueira. Após o sedimento será homogeneizado e separado em duas partes:

Cerca de uma colher de sopa de sedimento será transferido para um Becker e seco à 40°C (aproximadamente 24h) em estufa para ser enviado para análise de mineralogia (≈ 10 g). A fração separada para análise de mineralogia será devidamente identificada e enviada imediatamente para os responsáveis da análise.

O restante da amostra será enviado ainda úmida para análise de granulometria no Malvern (granulômetro à laser).

Na fração grossa será feito o fracionamento da fração via seca: após seco, o sedimento de cada amostra será colocado em uma torre de peneiras com intervalo de granulometria de 0,5 phi. As peneiras serão alinhadas de forma que a maior porosidade fique no topo e a menor, na base da torre. Colocar cerca de 40 g de sedimento no topo e colocar a torre em agitação por 15 minutos. Terminada a agitação, o sedimento retido em cada peneira será pesado em uma balança de precisão e transferido para pequenas sacolas plásticas devidamente identificadas (nome da amostra e phi). Os pesos serão devidamente planilhados.

Obs: O somatório dos pesos dos intervalos (phis) não pode ser superior ao peso inicial da fração grossa (peso do sedimento seco após separação via úmida).

- Análise do teor de carbonato de cálcio (CaCO₃)

Cerca de 20 g da amostra bruta será novamente separada via úmida como descrito previamente e as duas frações seguirão separadamente para a remoção do CaCO₃ como descrito abaixo.

Fração grossa: após separação, a fração grossa será transferida para um Becker (previamente pesado) e seca à 40°C. Depois de seca, a fração grossa será pesada em uma balança de precisão e o peso do sedimento (peso sedimento + Becker – peso do Becker) será planilhado. Após o Becker contendo o sedimento seco e já pesado será colocado em uma capela de exaustão de gases (ligada) para a adição lenta e gradual de HCl (30%) com o auxílio de uma pisseta. O procedimento continua até que a adição de HCl não provoque mais reação (borbulhamento). Terminada a queima do carbonato, o sedimento será lavado 3 vezes com água e seco em estufa à 40°C. Após seco, o Becker com o sedimento é novamente pesado e o teor de carbonato de cálcio será o sedimento pré-queima subtraído do sedimento pós-queima corrigido para porcentagem.

Fração fina: a fração fina será deixada em repouso para decantação com posterior drenagem. Após o dreno, a amostra segue como descrito acima para a queima do CaCO₃ da fração grossa.

- Análise dos dados

A análise de semivariograma será utilizada para determinar a variabilidade espacial dos metais analisados e expressar o grau de dependência espacial entre as amostras. O semivariograma é um gráfico que representa a semivariância dos dados $\gamma(h)$ em relação à distância correspondente que os separa (h), podendo ser definido segundo a Equação 9 (Vieira et al., 1983):

$$\gamma(h) = (1/2)E\{[Z(x_i) - Z(x_i + h)]^2\}$$

Equação 9

O qual pode ser estimado segundo Equação 10:

$$\hat{\gamma}(h) = \frac{\sum_{i=1}^{n(h)} [z(xi+h) - Z(xi)]^2}{2n(h)}$$

Equação 10

Sendo $n(h)$ número de pares amostrais $[z(xi); z(xi + h)]$ separados pelo vetor h , sendo $z(xi)$ e $z(xi + h)$, valores numéricos observados do atributo analisado, para dois pontos xi e $xi + h$ separados pelo vetor h .

Normalmente, o conjunto de pontos amostrais se comporta como, intuitivamente, se deve esperar de dados de campo, ou seja, que as diferenças $[z(xi) - z(xi + h)]$ aumentem à medida que h , a distância que os separa, aumente.

Os componentes, efeito pepita (Co) e patamar ($Co+C$) são utilizados para determinar o grau de dependência espacial (GD) conforme equação Equação 11 (CAMBARDELLA et al., 1994):

$$GD = \frac{Co}{Co + C} 100$$

Equação 11

Semivariogramas que apresentam grau de dependência espacial menor ou igual a 25% têm forte dependência espacial. A dependência é moderada quando esta relação variar de 25 a 75% e fraca quando esse valor for superior a 75%.

O semivariograma é uma função do vetor h e, portanto, depende de sua direção e magnitude. Dependendo do comportamento do gráfico do semivariograma em diferentes direções ele pode ser chamado de isotrópico ou anisotrópico (VIEIRA, 2000).

Para obtenção dos mapas tridimensionais de relevo e dos atributos estudados será utilizado o programa SURFER (Golden Software, 1997), e os dados serão interpolados por meio da técnica da krigagem, a qual utiliza os parâmetros do semivariograma.

Para o ajuste dos modelos matemáticos aos semivariogramas será utilizado o método de validação “*Jack-knifing*”, no qual serão analisados os valores de média e variância dos erros reduzidos (SOUZA, et al., 1997), os quais serão considerados os modelos: esférico, exponencial, linear e gaussiano.

f) Experimentos ex situ

- Cultivo de *Rhizophora mangle*

Os propágulos serão cultivados em vasos de 5L. 500ml de solução de Hoagland & Arnold (1950) a meia força com salinidade 20 e pH 5,5 a 6,5. Os propágulos passarão por um processo de assepsia, consistindo em lavagem em água corrente com detergente neutro, para retirar a lama, a areia e possíveis micro-organismos.

Para a confecção de um litro de solução serão usados 136,09g de KH_2PO_4 ; 101,11g KNO_3 ; 236,11g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 246,48g $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$, sendo esses denominados macronutrientes. Para a confecção dos micronutrientes serão utilizados 2,844g de H_3BO_3 ; 0,075g de CuSO_4 ; 2,13g MnSO_4 ; 0,018g $\text{NH}_4\text{M}_2\text{O}_7$; 0,374g ZnSO_4 . Para a produção da solução estoque de FeEDTA serão utilizados 33,5g/L de Na EDTA e 24,33g/L de FeCl_3 . Para adequação da concentração salina será utilizado 14,61g/L de NaCl.

A diluição dos componentes da solução padrão serão diluídos em balões volumétricos calibrados para um litro, sendo os nutrientes completamente diluídos em água destilada.

Para avaliar a interferência de ferro e alumínio no desenvolvimento inicial de *R. mangle* serão realizados dois experimentos, inicialmente a planta ficará em aclimação para se evitar possíveis interferências nos resultados. Após esse período, os propágulos serão separados em grupos onde irão ser acrescentados os devidos contaminantes.

Para avaliar o efeito do ferro no desenvolvimento dos propágulos e plântulas será utilizado cloreto férrico (FeCl_3). Serão testados inicialmente os tratamentos com as seguintes concentrações: 45 (controle), 90, 135, 180 e 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Para o efeito do alumínio será utilizado sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) além do controle na ausência do alumínio, serão testados inicialmente os tratamentos com as seguintes concentrações: 0,19; 1,11; 2,22 e 3,33 mmol.L^{-1} .

Para cada metal a ser testado serão utilizados 4 propágulos por recipiente com 6 repetições por tratamento, totalizando 30 recipientes por tratamento e 120 propágulos.

Durante todo o cultivo serão analisados o número de folhas emitidas pelas plântulas, monitorado o crescimento de epicótilo, e registrado qualquer alteração morfológica nos indivíduos. As folhas que se desprenderem serão coletadas e devidamente enumeradas para que possam ser processadas e rotuladas. Também serão coletados os dados de área foliar, fluorescência da clorofila a e fotossíntese, conforme já descrito no item 3.4.2.

Será realizada a caracterização anatômica do tecido vegetal tanto de material de referência quanto de amostras obtidas do cultivo.

Material fresco de áreas não contaminadas em território capixaba será coletado para servir de material de referência aos experimentos de contaminação por metais. Durante estas coletas deverão ser informados dados referentes a: mês de coleta, temperatura, condições climáticas e de georeferenciamento.

O material será fixado em solução de F.A.A. (formaldeído, ácido acético e etanol 50% na proporção de 0,5:0,5:9) por 48 horas, seguido de conservação em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Posteriormente serão clarificados com hipoclorito de sódio 3% e corados com safranina (1%), sendo utilizada água destilada para montagem das lâminas (BUKATSCH, 1972). As seções serão

observadas em microscópio óptico e fotodocumentadas para posterior medição das características anatômicas: espessuras da epiderme, parênquima clorofiliano, parênquima aquífero e determinação do número de estômatos.

Serão identificados de 10 indivíduos por área amostrada e coletadas 10 folhas por planta, sendo 5 utilizadas para os cortes paradérmicos e 5 para os cortes transversais. Para efeito de padronização serão coletadas as folhas expandidas do segundo par a partir do ápice para a base do ramo.

As amostras dos experimentos de cultivo serão coletas e fixadas conforme descrito anteriormente. Serão realizados cortes anatômicos (paradérmicos e transversais) de folhas dos indivíduos dos tratamentos testados. Serão coletas 5 folhas por tratamento para cada tipo de corte. As secções serão observadas em microscópio óptico e fotodocumentadas para posterior medição das características anatômicas: espessuras da epiderme, parênquima clorofiliano, parênquima aquífero e determinação do número de estômatos.

- Biometria dos propágulos e análise de metais contaminantes

Serão avaliadas as seguintes variáveis: comprimento total inicial e final, comprimento do epicótilo inicial e final, volume de raiz, massa da matéria fresca e seca totais, massa da matéria seca por compartimento: raiz (MSR), hipocótilo (MSH) e parte aérea (MSA), epicótilo e folhas (quando presentes). Ao final do experimento todos os componentes serão secos em estufa a 60°C até peso constante.

Após avaliação e obtenção da massa da matéria seca serão realizados cálculos da taxa de crescimento relativo (RGR) calculada pela fórmula $RGR = [\ln(\text{biomassa total}) - \ln(\text{biomassa inicial do propágulo})] / (\text{tempo do tratamento (semanas)})$ retirada de Pattinson et al. (1998) e utilizada em propágulos de *R. mangle* por Krauss e Allen (2003).

Para o cálculo da biomassa inicial dos propágulos, será realizada correlação entre comprimento total do propágulo e sua biomassa seca total. Será calculado o incremento de biomassa até o início dos tratamentos (peso inicial de coleta – peso início do tratamento) e incremento de biomassa final (peso final dos tratamentos – peso início dos tratamentos).

Para a análise da concentração dos metais contaminantes, as amostras secas serão enviadas para análise em laboratório credenciado.

A atividade antirradicalar também será avaliada nos extratos polares e apolares em diferentes concentrações. Para fins de comparação, será determinada a atividade antioxidante dos extratos para analisar o efeito da matriz.

- Método do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A avaliação da capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical superóxido será baseada na geração do radical $O_2^{\bullet-}$ através do sistema enzimático pela reação da hipoxantina catalisada pela enzima xantina oxidase proposto por Zhao e colaboradores (2006). Serão adicionados

100 µL de amostra à solução de reação, que consistirá em 100µL de uma solução de EDTA 30 mM; 100µL de uma solução 3 mM de hipoxantina e 200 µL de uma solução 1,42 mM de Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Após a mistura será pré-incubada a temperatura ambiente por três minutos, será adicionado 100 µL de uma solução de xantina oxidase com concentração 0,75 U/mL e o volume será completado até 3mL com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). A solução final será então incubada em temperatura ambiente por 40 minutos e a absorvância será medida em espectrofotômetro em 560 nm. A atividade de sequestro do radical superóxido será calculada utilizando a Equação 12:

$$O_2^- \text{ atividade antioxidante (\%)} = \left[1 - \frac{(S - S_B)}{(C - C_B)} \right] \times 100$$

Equação 12

Onde S, S_B, C e C_B são as absorvâncias da amostra, do branco da amostra, do controle e do branco do controle respectivamente.

- Método do radical hidroxila (HO•)

A atividade antirradicalar das amostras em estudos, e dos padrões analíticos em diferentes concentrações frente ao radical hidroxila será avaliada utilizando o método da 2-desoxi-D-ribose proposta por Zhao e colaboradores (2006), com algumas modificações. O FeCl₃• 6H₂O e ácido ascórbico serão preparados em água mili-Q antes do uso. Em um tubo, onde será efetuada a reação, será adicionado 100 µL do extrato, 100 µL de EDTA 1 mM, 100 µL de FeCl₃• 6H₂O 1 mM, 100 µL de 2-desoxi-d-ribose 36 mM, 100 µL de H₂O₂ 10 mM, e 100µL de de ácido L-ascórbico 1 mM em tampão fosfato 25 mM (pH 7,4), após o volume será completado até 1,0 ml com tampão fosfato. Em seguida, será incubado a 37 ° C durante 1 h, a reação será interrompida pela adição de 1,0 mL de TCA a 10% (m / v) e 1,0 mL de 1,0% de TBA (m/v) em tampão fosfato (pH 7,4). A mistura será aquecida em num banho a 37°C durante 15 min. Após, as amostras serão resfriadas, e o volume final ajustado para 5,0 ml com água deionizada e a absorvância será medida em espectrofotômetro em 532 nm. A atividade antioxidante das amostras será calculada de acordo com a Equação 13abaixo:

$$AA_{OH} = \left(1 - \frac{(S - S_B)}{(C - C_B)} \right) \times 100$$

Equação 13

Onde S, S_B, C e C_B são as absorvâncias da amostra, do branco da amostra, do controle e do branco do controle respectivamente.

- Método do radical peroxila (ROO•)

A avaliação da atividade antirradicalar dos extratos frente ao ROO• será realizada pelo método fluorimétrico, no qual emprega-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH₂-DA) como substrato. Para a montagem da placa de análise contendo 96 poças, a mesma será dividida em duas regiões, sendo que a região 1 (branco das medidas) corresponde as linhas A, B, C e D, e a região 2

corresponde as linhas E, F, G e H. As 3 primeiras poças, tanto na região 1 quanto na 2, são reservadas para o solvente, em que será adicionado 10 µl do solvente utilizado nas amostras. No restante da placa, será adicionado 10 µL de amostra em triplicata (3 poças) na região 1 e na região 2. Após será adicionado o tampão de reação (127,5 µL), em todas as poças da placa. Por fim, adiciona-se 7,5 µL de água ultrapura na região 1 e 7,5 µL da solução de ABAP (4 mmol.L-1) na região 2. Imediatamente antes da análise da placa, no fluorímetro, será adicionado 10 µL de DCFH2-DA (16 µmol.L-1), previamente desacetilado. O fluorímetro será programado para manter a temperatura a 37°C e medir a fluorescência nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão) a cada 5 minutos, num intervalo total de 30 minutos. O tampão de reação utilizado nesta determinação será composto de HEPES (30 mmol.L-1), KCl (200 mmol.L-1) e MgCl2 (1 mmol.L-1). A desacetilação química do DCFH2-DA, gerando o composto DCFH2, será realizada com a adição de 2,0 mL de NaOH (0,01 mol.L-1) em uma solução etanólica de (5 mmol.L-1) de DCFH2-DA, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após 30 minutos, será adicionado 10 mL de tampão fosfato 25 mmol.L-1 (pH 7,4), composto de fosfato mono e dibásico, armazenando-se a solução em gelo até o momento do uso. A atividade antirradicalar contra o radical peróxil (AAROO•) das amostras será determinada com base na medida referente ao tempo de 30 minutos de reação, e calculada conforme Equação 14 abaixo:

$$AA_{ROO^{\bullet}} = \left(1 - \frac{(F_A - F_{AB})}{(F_S - F_{SB})} \right) \times 100$$

Equação 14

Onde FA é a fluorescência da amostra, com ABAP, FAB é a fluorescência do branco da amostra, sem ABAP, FS é a fluorescência do solvente utilizado nas amostras, com ABAP, e FSB é a fluorescência do branco do solvente, sem ABAP.

- Método do radical DPPH

A atividade antioxidante das amostras será avaliada da seguinte forma: 1500 µL da amostra serão adicionadas a 1480 µL da solução de DPPH e 20 µL da solução de trabalho. Paralelamente será conduzido um branco para cada amostra contendo 1500 µL da amostra e 1500 µL de solução de trabalho. Será necessário conduzir um branco para o DPPH para o cálculo da atividade antioxidante, dessa forma 1480 µL de DPPH serão adicionados a 1520 µL de solução de trabalho. Após 30 minutos de reação sob abrigo da luz as absorvâncias serão medidas em espectrofotômetro em 522 nm. A porcentagem da atividade antioxidante frente ao radical DPPH será calculada conforme Equação 15.

$$AA_{DPPH} = \left(\frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \times 100$$

Equação 15

Onde A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH, A e A_B são as absorvâncias da amostra e branco, respectivamente.

g) Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê

Os resultados obtidos com a caracterização dinâmica do estuário serão utilizados para caracterização do ambiente e no estudo de modelagem numérica.

h) Mapeamento dos habitats das espécies de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos Rios Piraquê (Açú e Mirin), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz

Após a amostragem dos dados, será utilizado o Sistema de Informações Geográficas SPRING® (INPE) para manipulação e tratamento das imagens, empregando diferentes algoritmos de composição, suavização, tratamento de contraste, filtragem, mosaicagem e demais processamentos complementares de imagem e segmentação.

Inicialmente vai ser realizada a segmentação da imagem, empregando-se os algoritmos de classificação por regiões. Depois de avaliar os resultados, se iniciará o processo de classificação supervisionada por pixel, para efeito comparativo.

Os arquivos resultantes das etapas de processamento vão ser incorporados ao SIG ArcGIS® (ESRI), para a representação final do processo de classificação supervisionada dos ambientes vegetacionais e geração das grades que poderiam representar de modo filigranado a variabilidade de ambientes frequentados pela fauna estudada.

O mapeamento das unidades da paisagem vai ser realizado no SIG ArcGIS® (ESRI).

O Banco de Dados Georeferenciado vai ser também implementado no SIG ArcGIS® (ESRI). A leitura das regiões será realizada por meio da grade de pontos de coleta amostrados durante o projeto (tabela de dados em formato MS Excel® convertida para um arquivo em formatoshapefile).

A produção de mapas temáticos vai incorporar os dados tabulares de pontos amostrais e respectivos valores de parâmetros ambientais e densidade, juntamente com as imagens em formato GeoTIFF.

No primeiro ano serão realizadas campanhas em cada uma das áreas para determinação da posição geográfica em tempo real para a determinação do habitat das espécies avaliadas neste item. Para perfeito ajuste das coordenadas serão realizadas expedições em busca do nível geodésico de referência mais próximo, quando possível (posicionamento relativo cinemático em tempo real).

Quando não possível serão realizadas campanhas de 04 horas com a implantação da base e do rover do RTK (posicionamento relativo cinemático, como já foi explicado) para obtenção de dados precisos que serão ajustados por triangulação com as estações de referência mais próximas (Vitória,

Viçosa e Teixeira de Freitas). Após estes cuidados serão realizadas as campanhas para determinação da distribuição do habitat das espécies.

Estes dados serão transferidos para o banco de dados e monitorados ao longo dos cinco anos para elaboração dos mapas temáticos anuais para cada uma das áreas. Para isto será necessário a aquisição de imagens de alta precisão já georeferenciadas para que sejam utilizadas de base e complementares as imagens de Landsat de distribuição gratuita.

As informações obtidas no decorrer da pesquisa vão ser armazenadas em um Banco de Dados Ambientais Georeferenciados, construído sob a ótica dos Sistemas de Informações Geográficas (SIG's), que facilitam sobremaneira a gestão ambiental, no sentido de as informações poderem ser acessadas de forma rápida e racional.

4.5.2. Restinga

a) Inventário Florístico

O material coletado, prensado e inicialmente seco em campo e transportado ao Herbário VIES, em Vitória, continuará o processo de secagem até o período completo de cinco dias, após o qual será encerrado em sacos plásticos e levados ao freezer para descontaminação, por sete dias. Após a descontaminação, as exsicatas serão montadas, identificadas e preparadas para depósito no Herbário VIES, da Universidade Federal do Espírito Santo.

A identificação das espécies será realizada por meio de chaves analíticas, diagnoses, descrições, ilustrações presentes na literatura, tipos nomenclaturais e consulta às coleções depositadas no Herbário VIES, VIC e nos herbários virtuais REFLORA e INCT. Dois workshops com a equipe de trabalho serão realizados para a identificação de espécimes com maior grau de dificuldade de identificação. Todas as exsicatas serão digitalizadas e, após aprovação do relatório final do projeto, serão disponibilizadas ao público em geral nos herbários virtuais REFLORA e INCT. Duplicatas serão enviadas aos herbários que possuem pesquisadores vinculados ao projeto. A lista de espécies inventariadas será apresentada de acordo com a classificação do APG IV (2016), contendo informações sobre endemismo e raridade, de acordo com literatura específica (Flora do Brasil 2020, em construção; Giulietti et al. 2009; Dutra et al. 2015); e estado de ameaça, de acordo com o Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli & Moraes 2013) e a lista das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo (Simonelli & Fraga 2007, ou versão atualizada). Espécies exóticas ou naturalizadas serão identificadas.

b) Biota do Solo: Capacidade de recuperação da vegetação

No Laboratório de Ecofisiologia de Sementes Florestais (LASEF) da UFES, as amostras serão passadas por peneira grossa, para retirada de tocos, raízes e para destorroamento, seguida por peneiras granulométricas de diferentes meshes a fim de separá-las por tamanho. Por final as

sementes serão então medidas com o uso de um paquímetro, para determinação das suas dimensões.

As sementes serão então colocadas para germinar em bandejas plásticas ou de alumínio contendo o solo do local previamente esterilizado com uma camada de vermiculita na base, em câmara de crescimento à temperatura constante e fotoperíodo compatível com época da coleta (verão com dias mais longos e inverno, com dias mais curtos). As bandejas serão irrigadas de acordo com a necessidade.

Semanalmente serão verificadas e contadas as plântulas emergentes durante os primeiros 30 dias e após esse período, de 15 em 15 dias pelos próximos 30 dias. As plântulas emergidas serão contadas, identificadas e removidas das bandejas e será avaliada sua normalidade (capacidade de formar plântulas com estrutura morfológica completa, raiz, primeiras folhas e eixo cotiledonar). Após o período de monitoramento de 60 dias, será realizado o Teste do Tetrazólio nas sementes remanescentes em cada amostra, a fim de verificar a viabilidade dos embriões, permitindo uma análise mais acurada do comportamento do banco em termos de presença de dormência da semente ou perda da viabilidade por morte do embrião.

Análises estatísticas dos dados serão realizadas a fim de comparar os bancos de sementes presentes nos oito pontos amostrais. Serão calculados o índice de diversidade de Shannon, número de sementes germinadas, número de sementes mortas e dormentes e densidade de sementes por ponto amostral.

c) Biota do Solo: Microbiota e Microbioma

No Laboratório Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), as amostras de solo serão processadas para o isolamento de bactérias do solo, rizosfera e rizoplano, realizado através do plaqueamento de suspensões preparadas com 10g de solos, solos rizosféricos ou raízes em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) agitados durante 30 minutos. As diluições seriadas serão plaqueadas (100 μ L) em meio extrato de solo (Pramer & SCHMIDT, 1964) contendo 100 mg.L⁻¹ de cicloheximida. Durante 21 dias de incubação a 28°C, colônias bacterianas individualizadas surgidas serão repicadas para tubos de ensaios com meio 523 de Kado & Heskett (1970).

Em seguida, será avaliada a capacidade de quelar ferro, inicialmente estabelecida pela capacidade de produzir sideróforos, sendo utilizado meio King B + azul de cromoazurol (SCHWYN; NEILANDS, 1987). As bactérias serão semeadas nas placas e incubadas em BOD no escuro. A presença de halo avermelhado ao redor das colônias indicará a capacidade quelar Fe⁺³. A avaliação desta capacidade será quantitativa: medições dos diâmetros das colônias (\emptyset C) e dos halos formados (\emptyset H) em dois sentidos diametralmente opostos. Neste caso, os resultados serão expressos como diâmetro relativo de halo (\emptyset RH), calculado pela seguinte fórmula: \emptyset RH= (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C.

As bactérias produtoras dos maiores halos relativos serão avaliadas em meio líquido e por espectrofotometria, pelo procedimento universal, bem como pelo procedimento para catecolatos: as

avaliações serão realizadas em período de 40 minutos em temperatura ambiente, em dois comprimentos de onda 420 e 630 nm (adaptado de Macagnan, 2005).

A fim de determinar o microbioma do sedimento, o DNA total do solo será extraído e enviado para o seqüenciamento. Os dados do sequenciamento serão então, analisados, editados e comparados de forma a estabelecer o perfil da microbiota associada a cada amostra de solo coletada em ponto fixo. Serão colhidas amostras a cada 6 meses e o microbioma de cada ponto fixo será comparado ao longo do tempo.

d) Estrutura da vegetação

No Laboratório de Ecologia de Restinga e Mata Atlântica (LERMA) do CEUNES, os dados obtidos no levantamento fitossociológico possibilitarão a caracterização da estrutura da vegetação, utilizando-se descritores fitossociológicos absolutos e relativos de densidade, dominância, frequência e valor de importância (VI) segundo Brower e Zar (1984) calculados com o auxílio do programa Fitopac.

As identificações botânicas do material coletado em todos os tipos de vegetação analisados serão realizadas através de literatura especializada, comparações com exsicatas já identificadas existentes nos Herbário SAMES e CVRD e através de consultas a especialistas. O material botânico fértil será depositado no Herbário SAMES com duplicatas enviadas ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A classificação de famílias segue o sistema da APG IV (2016) para angiospermas e para licófitas e monilófitas será adotado o proposto por Smith *et al.* (2006).

Na análise fitossociológica serão calculados os parâmetros de frequência absoluta (FA, Equação 16), frequência relativa (FR, Equação 17), dominância absoluta (DoA, Equação 19), dominância relativa (DoR, Equação 19) e valor de importância (VI, Equação 21) de cada espécie encontrada (Brower e Zar 1984).

Frequência = Exprime a distribuição espacial de cada espécie na área. Indica o número de unidades amostrais que uma espécie ocorre e relação ao número total de unidades amostrais.

Frequência absoluta (FA) = indica a ocorrência de uma espécie em uma determinada área.

$$FA = nPe/nTP$$

Equação 16

Onde:

nPe = Número de parcelas com ocorrência da espécie

nTP – Número total de parcelas

Frequência Relativa (FR) = relação entre a frequência absoluta de determinada espécie com a soma das frequências absolutas de todas as espécies.

$$FR = \frac{FAi}{\sum FA} * 100$$

Equação 17

FAi = Frequência absoluta de uma determinada espécie.

$\sum FA$ = somatório das frequências absolutas de todas as espécies amostradas.

Cobertura Total da Espécie (CT) - calculada para obter o valor da dominância absoluta (Equação 18).

$$CT = \sum^n Ci$$

Equação 18

Onde:

C – cobertura da espécie em m^2

n – Número de parcelas

Dominância **Dominância absoluta da Espécie (DoA)** = refere-se à taxa de ocupação do ambiente pelos os indivíduos de uma dada espécie por unidade de área, geralmente por hectare.

$$DoA = CT \cdot U/A$$

Equação 19

Onde:

U – área

A – área total amostrada

Dominância Relativa da Espécie (DoR)

$$DoR = 100 \cdot DoA/DoT$$

Equação 20

Onde:

DoT = Somatória das dominâncias absolutas (m^2/ha)

Valor de Importância da Espécie (Vi) - caracteriza a importância de cada espécie na comunidade, reunindo os critérios de análise dos dois parâmetros (FR, DoR).

O **índice de valor de importância (VI)** será dado a partir da somatória da frequência e dominância relativas (Pereira *et al.* 1992; Menezes e Araújo 1999).

$$VI = FR + DoR$$

Equação 21

Para as espécies vegetais identificadas na área de estudo, será adotado o critério de classificação quanto à forma de vida apresentado por Mueller-Dombois e Ellenberg (1974) e utilizada por Menezes e Araújo (1999) descritas a seguir:

- Caméfitas – Plantas cujas gemas de brotamento situam-se no sistema aéreo abaixo de 0,5 m de altura.
 - .1. Caméfitas herbáceas escaposas (Che) – Sistema aéreo com um único eixo ortotrópico.
 - .2. Caméfitas herbáceas reptantes (Chr) – Sistema aéreo constituído por um ou mais eixos plagiotrópicos.
- Geófitas – Plantas com gemas de brotamento abaixo do nível do solo e com sistema aéreo morrendo periodicamente.
 - .1. Geófitas radicigemas (Gr) – Gemas de brotamento situadas nas raízes germiníferas.
 - .2. Geófitas rizomatosas (Gz) – Gemas de brotamento situadas em rizomas.

Os parâmetros fitossociológicos serão calculados de acordo com Brower e Zar (1984). Os índices de Densidade Linear e Cobertura Linear são resultantes do número de indivíduos amostrados (N) e intercepto total (L), respectivamente, divididos pelo tamanho da amostragem (1000 m), sendo seus valores proporcionais e, portanto, desnecessários e suprimidos. O parâmetro de Frequência Absoluta (F) está relacionado à porcentagem de ocorrência da espécie na unidade amostral e o Valor de Importância (VI) é resultante da somatória dos valores relativos de Densidade Linear, Cobertura Linear e Frequência. Optaremos pelo índice de Shannon (H') para o cálculo da diversidade e pelo índice de Pielou (J) para equidade.

e) Metabolismo primário: Sistema fotossintético

No Núcleo de Estudos da Fotossíntese da UFES (NEF/UFES), amostras foliares coletadas e preservadas sob resfriamento serão avaliadas quanto a eficiência do fotossistema II (FSII) será estimada por medição da fluorescência da clorofila utilizando um fluorômetro IMAGING-PAM Série M (Walz, Efeltrich, Alemanha), versão MINI com portabilidade. (Dos Anjos *et al.* 2012; Guidi e Calatayud 2014) enquanto a eficiência do FSI e a queda da fluorescência será estimada com um M-PEA segundo Strasser *et al.* (2010).

As amostras foliares serão utilizadas para a análise dos pigmentos fotossintéticos em laboratório, sendo os teores de clorofilas determinados por meio de análise espectrofotométrica de extratos obtidos pela maceração de discos em DMSO (Lichtenthaler, 1987, Porra *et al.* 1989). As concentrações foliares dos pigmentos carotenóides xantofilas (neoxantina, violaxantina,

anteraxantina, luteína e zeaxantina) e carotenos (α -caroteno e β -caroteno) serão quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (Matos *et al.* 2009, Gallon *et al.* 2013).

f) Metabolismo primário: Carboidratos não estruturais, polímeros de parede celular e metabólitos primários

Na Unidade de Crescimento de Plantas, da Universidade Federal de Viçosa (UCP/UFV), amostras foliares serão submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Ferne *et al.*, 2001), aminoácidos totais (Gibon *et al.*, 2004), e malato e fumarato, segundo Nunes-Nesi *et al.* (2007). Na fração insolúvel, determinaram-se os teores de amido e proteína total (Ferne *et al.*, 2001; Gibon *et al.*, 2004). Os níveis de outros metabólitos serão quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) objetivando avaliar as alterações no perfil metabólico do indivíduo. Os metabólitos serão identificados em comparação com banco de dados criados a partir de padrões autênticos e a anotação dos picos detectados seguirão as recomendações descritas em Ferne *et al.* (2011).

Amostras das folhas das espécies funcionais serão também analisadas quanto aos teores de celulose, hemiceluloses e ligninas visando avaliar os danos do acidente ambiental nos componentes estruturais das plantas, as análises serão realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da UFES. Para a celulose, o protocolo será o de Brendel *et al.* (2000) e para hemiceluloses, o protocolo de Shädel *et al.* (2010), com algumas alterações. O resíduo livre de extrativos (carboidratos solúveis e amido) será hidrolisado com ácido trifluoroacético 2N (TFA), de acordo com Saeman *et al.* (1945), e a análise qualitativa da proporção de monossacarídeos das frações de hemicelulose (xilose, arabinose, galactose, manose, glicose, ramnose e fucose) será determinada por HPLC usando padrões Sigma®. A extração e determinação do teor de lignina seguirá o protocolo de Dos Santos *et al.* (2008) e leitura em espectrofotômetro em 280 nm.

g) Metabolismo primário: Sistema anti-oxidante

Serão determinadas as atividades de enzimas chaves do sistema antioxidante: dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidase ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e redutase da glutatona (GR; EC 1.8.1.7). Amostras de tecido vegetal serão homogeneizadas em um meio de extração gelado contendo tampão fosfato de potássio, EDTA, DTT, ácido ascórbico e PVPP, em concentrações apropriadas, modificados de Lima *et al.* (2002) e Pinheiro *et al.* (2004). A atividade total da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do corante azul de nitro-tetrazólio a 560 nm. Para a atividade da CAT será estimada pela medição da taxa de decomposição do H₂O₂ a 24 nm, enquanto a atividade total da APX será determinada pelo declínio da absorvância a 290 nm. E finalmente, a atividade da GR será estimada pela determinação da taxa de oxidação do NADPH a 340 nm.

A atividade antioxidante total (AAT) será estimada pelo método de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) descrito por Benzie e Strain (1996). A reação ocorre pela formação de um complexo entre o substrato TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Ferro (III), quantificado

espectrofotometricamente. Também serão determinados a extensão de danos celulares sofridos pelas diferentes espécies, determinada pela quantificação do acúmulo de aldeído malônico (MDA), estimado como o conteúdo total de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico e espectrofotometricamente obtidas em leituras a 440, 532 e 600 nm, conforme descrito em Lima *et al.* (2002). Os teores de ascorbato reduzido (AA), oxidado (DHA) e total (AA + DHA) assim como o conteúdo de glutatona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (GSH + GSSG) serão determinados segundo Davey *et al.* (2003). A análises serão realizadas no NEF/UFES e UCP/UFV.

h) Metabolismo primário: Componentes anato-estruturais

No Laboratório de Botânica do CEUNES/UFES serão realizadas análises anatômicas, onde serão realizadas secções transversais com auxílio de lâmina de barbear e isopor da região mediana das folhas das respectivas espécies para as três fisionomias amostradas. O material seccionado será clarificado em hipoclorito de sódio 25%, corado com azul de alcian 0,5% e safranina 1% (Luque et al., 1996) e posteriormente montadas lâminas temporárias ou semipermanentes. As lâminas serão analisadas ao microscópio óptico e as imagens obtidas em fotomicroscópio com projeção de escalas micrométricas.

Secções paradérmicas, de ambas as faces, serão obtidas a mão livre da região mediana, posteriormente, clarificadas e coradas com solução de safranina a 1% e montadas entre lâmina e lamínula com glicerina 50% para estudo da epiderme em vista frontal, possibilitando avaliar o formato dos estômatos, a densidade, que será calculada a partir da contagem dos estômatos por área e o índice estomático (IE), calculado pela Equação 22:

$$IE = \frac{n^{\circ} \text{ de estômatos}}{n^{\circ} \text{ Total de células (epidérmicas + estomáticas)}} \times 100$$

Equação 22

A funcionalidade dos estômatos será calculada a partir a medição dos diâmetros polar (DP) e diâmetro equatorial (DE). As lâminas serão analisadas e as medidas feitas em microscópio fotônico usando projeção de escala micrométrica.

As análises estatísticas serão realizadas para os dados biométricos, como: altura da planta, espessura do limbo, comprimento e largura do limbo, pecíolo, índice e densidade estomática, funcionalidade dos estômatos. Todos esses dados obtidos serão submetidos a análise de variância (ANOVA) em experimento inteiramente casualizado, em seguida passaram pelo teste de normalidade. Para os dados não paramétricos será utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para a normalização, utilizando a fórmula $x = \sqrt{x}$, e posteriormente o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para a comparação de médias, utilizando o programa estatístico ASSISTAT Versão 7.7 beta (Silva e Azevedo 2009).

i) Análises físico-químicas do solo e tecidos vegetais

Amostras de solo e folhas serão secas em estufa de circulação forçada a 60°C, trituradas e enviadas ao Laboratório de Análises do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, para análises químicas onde serão determinados os teores de metais pesados/elementos traços bem a composição dos macros e micronutrientes.

Serão realizadas medidas das concentrações dos metais e elementos traços: Alumínio, Arsênio, Boro, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Ferro, Magnésio, Manganês, Mercúrio, Molibdênio, Níquel, Sódio e Zinco.

Será realizada a análise granulométrica das amostras do solo por peneiramento a seco e classificação de finos por uso de granulômetro a laser ou pipetagem, caso o teor lama esteja presente e seja significativamente superior a 10%. As amostras de sedimentos serão tratadas previamente com peróxido de hidrogênio (30%) para queima e eliminação de material orgânica pré-tratamento granulométrico. Os teores de matéria orgânica serão quantificados pela diferença do peso inicial e final, após tratamento com peróxido.

As amostras serão coletadas semestralmente (período seco e chuvoso), sendo cinco amostras coletadas em cada uma das três fitofisionomias nas oito estações amostrais, o que totalizará 240 amostras de sedimento e 240 amostras de folhas.

As análises serão realizadas pela decomposição das amostras com reagentes apropriados (HNO₃, HCl, H₂O₂) com grau elevado de pureza, utilizando aquecimento em forno microondas (ciclo: 25°C até 180°C em 5 min, isoterma por 10 min a 180°C) e diluídas com água ultra-pura em tubos de polipropileno apropriados para análise de traços.

Os elementos traço/metals serão determinados por espectrometria atômica (Absorção Atômica AAS, ICP OES e ICP-MS), a depender dos teores de cada elemento. Os resultados obtidos serão processados e calculados para o envio de um laudo.

4.6. ANEXO 6 - MONITORAMENTO AMBIENTAL DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE

4.6.1. Monitoramento com veículos aéreos não tripulados

a) Análise dos vídeos

Os vídeos/filmes registrados durante os Transectos (realizados pelo *Drone Transect*) e durante os voos de estudo de comportamento (realizados pelo *Drone Behavior*) serão analisados por pelo menos três (03) integrantes da equipe, em momentos distintos. Para cada vídeo serão registrados a data e o número do voo, bem como a altitude, velocidade do voo, incidência da pluma de sedimentos e dados do observador. Será utilizada uma (01) Ficha de Observação (Quadro 49), para cada grupo

analisado, a qual deverá ter registrado o tempo (em minutos e segundos) de início e o final da avistagem. Caso outro grupo ou indivíduo da megafauna seja observado, deverá ser registrado em outra Ficha de Observação. Se não for observado nenhum animal da megafauna na totalidade do vídeo, deverá ser anotada no item “Extra” a falta de registros. Cada voo deverá, portanto, ter ao menos uma (01) Ficha de Observação.

Quadro 49. Ficha de Observação para caracterização da Megafauna através dos vídeos editados do Drone Transect, e/ou dos vídeos completos do Drone Behavior.

FICHA DE OBSERVAÇÃO – 01		AVISTAGEM MEGAFUNA	
SOBRE O VOO:			
Data:	Nº Voo:	Drone: () Transect () Behavior	
Tempo Início:	Tempo Término:	Incidência de Pluma: () Sim () Não	
SOBRE O OBSERVADOR:			
Nome:			
Data da análise:			
SOBRE A MEGAFUNA:			
Espécie observada:		Posição Geográfica Inicial: Final:	
Nº do Grupo:		Foi possível observar algum comportamento? () Sim () Não	
Nº de Indivíduos:			
Quantidade indivíduos X faixa etária: Adultos _____ Juvenis _____ Neonatos _____ Indeterminados _____		Registro de Comportamento: Deslocamento: Principal () / Secundário () Alimentação: Principal () / Secundário () Interação: Principal () / Secundário ()	
SOBRE OS INDIVÍDUOS:			
Fotoidentificação: () Sim () Não Nº das fotos no Catálogo Foto ID: _____ _____		Tamanho(s) Estimado(s) do(s) Indivíduo(s) (Comprimento total em metros): _____ _____	
Com quantos minutos de observação do grupo/indivíduo foi possível registrar o comportamento? _____		EXTRAS:	

b) Caracterização da megafauna

Cada avaliação será específica para cada grupo, em Ficha de Observação individualizada, além do tempo de início e do final da avistagem deverá ser registrada também a posição geográfica de início e final da observação. É considerado “grupo”, qualquer observação a partir de um (01) indivíduo.

Será identificado o número de animais encontrados em cada observação diferenciando em adultos, juvenis (até $\frac{3}{4}$ do tamanho do adulto) e neonatos ($\frac{1}{4}$ do tamanho do adulto). O tamanho do(s) indivíduo(s) deverá ser estimado sempre que houver a possibilidade.

O comportamento (Deslocamento, Alimentação e Interação) deverá ser registrado sempre que possível, assim como o tempo de observação necessária para determinar tal atividade. Quando houver possibilidade, serão feitas fotografias (*frames*) para fotoidentificação dos indivíduos da megafauna. Essas imagens serão catalogadas para futuras análises de composição de grupo.

Após cada integrante fazer a sua análise, elas serão comparadas para avaliar se todos os grupos foram observados. A análise final e validação de todos os dados coletados e informações anotadas ficará a cargo de um dos Coordenadores de Megafauna. Após validação, estas informações deverão compor o Banco de Dados de Observação de Megafauna Através de Monitoramento Aéreo Não Tripulado (Parâmetros de Monitoramento).

c) Edição dos vídeos

Durante a análise dos vídeos, o tempo de início e de final de todas as avistagens (podendo ser mais de uma por tempo total de vídeo), será registrado com o objetivo de obter o tempo de vídeo que deverá ser editado para futuras análises de caracterização do grupo observado. Após a detecção dos tempos (minutos e segundos) de vídeo com registro de animais da megafauna, será realizada a edição da velocidade (*speed*) desse vídeo com um avanço rápido (*fast forward*) nos momentos em que não houver a observação da megafauna, e uma câmera lenta (*slow motion*) enquanto houver a presença de algum grupo.

4.6.2. Monitoramento de aves marinhas

a) Censo de praia

A metodologia de censo será complementada pelas metodologias internacionalmente aceitas, descritas em Bibby et al. (1992). Dados quali-quantitativos, como lista com identificação de espécies, status de ameaça de extinção e endemismo, guilda trófica, espécies indicadoras, área de vida, padrões de distribuição, abundância, riqueza e biodiversidade, serão analisados.

b) Análises hematológicas

Os esfregaços serão preparados com sangue fresco imediatamente após a colheita. Serão fixados por imersão em metanol absoluto por alguns segundos, e após secarem serão embrulhados em papel alumínio e congelados para assegurar sua conservação até a coloração (Peirce & Prince 1980). Os esfregaços serão corados utilizando uma coloração de Wright modificada (Kyro-Quick, Kyron Laboratories Ltd, Benrose, África do Sul). Os esfregaços serão examinados sob microscopia ótica (magnificação 1000x), sendo avaliados 100 leucócitos para contagem diferencial de heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos. O número de campos microscópicos examinados será

registrado concomitantemente com a contagem diferencial de leucócitos, de modo a permitir o cálculo da densidade relativa de leucócitos (leucócitos por campo) além da busca minuciosa por hemoparasitas.

Para a realização da contagem manual será utilizado um hemocitômetro (câmara de Neubauer) que será preenchido com a amostra diluída de sangue. Após o preenchimento deve-se esperar 5 minutos para as células se acomodarem na superfície da grade, antes da leitura. Para a contagem de eritrócitos será utilizado o diluente Natt & Herrick, que constitui um método direto de contagem, tanto de eritrócitos como de leucócitos. Será utilizado na proporção 1:200 e os cálculos para eritrócitos serão feitos contabilizando-se todas as células em cinco dos pequenos quadrantes do quadrado central da câmara e multiplicando o número obtido por 10.000, obtendo-se assim o total de eritrócitos por microlitro de sangue. Para os leucócitos, a contagem será feita nos nove quadrados que constituem a grade. Ao valor obtido é somado 10%, e o resultado é multiplicado por 200, indicando o número total de leucócitos (WBC) por microlitro de sangue (Walberg, 2001).

c) Análises microbiológicas

As análises microbiológicas serão realizadas através do método de semeadura, incubação e isolamento, procedimentos esses padronizados pelo Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratórios (CLSI). O processo é composto por diferentes etapas que, em termos gerais, envolvem a homogeneização da amostra, diluições seriadas e inoculação em meios de cultura específicos para a formação das colônias bacterianas. As cepas isoladas são identificadas com base na aparência e nos resultados dos exames laboratoriais padrão, que consistem no exame direto com coloração Gram e Ziehl-Neelsen, além de provas clássicas da catalase, coagulase, oxidase e urease. Os antibiogramas serão determinados pelo método de difusão em disco em ágar Mueller Hinton. A técnica envolve a utilização de discos de papel filtro impregnados com quantidades determinadas de antibióticos específicos, dispostos ordenadamente sobre a superfície do meio, com posterior incubação das placas a 37°C por cerca de 24 horas.

d) Análises moleculares para identificação de patógenos

As análises de PCR serão realizadas pelo Grupo São Camilo – Medicina Diagnóstica. A técnica utilizada será a de PCR em tempo real, que combina a amplificação de sequências específicas de DNA com a detecção fluorescente dos amplicons, simultaneamente (Espy *et al.*, 2006). Diferentes marcadores poderão ser utilizados, sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador para PCR em tempo real.

As amostras amplificadas pela PCR serão submetidas à análise por sequenciamento, sendo essa última realizada pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). A purificação do produto amplificado será realizada com uma combinação de duas enzimas: Shrim Alkaline Phosphatase (SAP), que degrada os nucleotídeos não incorporados e a Exonuclease I (EXO), que degrada *primers* residuais e demais produtos de fita simples indesejáveis. Para isso, serão misturados o produto da PCR e quantidades de ExoSap (USB, Cleveland, Ohio, USA) de acordo com as indicações do fabricante e

serão incubadas em termociclador por 15 minutos a 37°C e depois por 15 minutos a 80°C. Para a reação de sequenciamento será utilizado BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (cod. 4337456, Applied Biosystems, CA, USA), utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, CA, USA).

e) Análises de variabilidade genética

Para as análises de variabilidade genética, o DNA extraído com kits comerciais será utilizado para amplificação de *loci* específicos de microssatélites para as espécies alvo via método de PCR. Serão analisados, em média, cerca de dez *loci* independentes para cada espécie alvo que apresentem variabilidade, conforme testes preliminares. Serão utilizados primers marcados com corantes fluorescentes para posterior genotipagem em sequenciador automático. Os corantes mais utilizados nestes procedimentos são 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) e HEX (HEX Phosphoramidite), mas outros corantes poderão ser selecionados de acordo com as especificações do sequenciador ou leitor de fluorescência utilizados. As reações de PCR serão realizadas nas temperaturas de anelamento estabelecidas para cada conjunto de primers, nas quais as condições gerais incluem desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento na temperatura específica de cada primer por 45 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados serão submetidos a genotipagem em sequenciador automático na empresa MacroGen (Seul, Coreia do Sul). A definição dos picos e tamanhos dos alelos será realizada com o software GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems).

Testes de independência entre loci serão calculados pelo programa Arlequin v. 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010) utilizando o algoritmo de expectativa de maximização (EM), através de 10000 permutações. A diversidade genética das populações será quantificada através de estimativas de proporção de loci polimórficos, número de alelos por locus, riqueza de alelos por população (A), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) e heterozigosidade média (H), utilizando o programa Popgene v.1.32 (Yeh et al., 1997). O equilíbrio de Hardy-Weinberg por locus e por população será testado a partir de cadeia de Markov de 100.000 passos com o programa Arlequin. A diferenciação genética entre as populações será estimada através da análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992) no intervalo de confiança de 95% após 1000 permutações, onde será calculado o índice de fixação θ_{ST} no programa Arlequin. Esta análise baseia-se na estatística F de Wright (1949), que calcula a heterozigosidade média das populações em relação à heterozigosidade esperada em cruzamentos aleatórios, o que indica o isolamento de uma população por diminuição do fluxo gênico. O índice θ_{ST} é análogo à medida de diferenciação FST, mas inclui uma correção para tamanhos desiguais de amostras (Weir & Cockerham 1984). Também serão calculados os coeficientes de endogamia FIS (redução de heterozigosidade de um indivíduo devido à inexistência de cruzamentos aleatórios dentro da população) no software Arlequin.

Índices de diferenciação como estimativas de Nm (número de migrantes por geração) e RST também serão calculados com o programa Fstat, v.2.9.3.2 (Goudet, 2001) O índice RST também é análogo ao

FST de Wright (1949), mas é uma medida mais apropriada para análises com microssatélite pois considera altas taxas de mutação e assume modelos de evolução, como o stepwise, que explica mais adequadamente às mudanças no tamanho dos alelos destas regiões repetitivas do genoma (Slatkin, 1995). A estruturação genética (número de grupos geneticamente próximos dentro das espécies) será estimada através do software Structure v. 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), que calcula a probabilidade de cada indivíduo pertencer a um determinado grupo genético, sem informação prévia sobre qual a população de origem daquele indivíduo. Este método é muito útil pois detecta grupos genéticos que podem englobar várias populações ou estruturação intrapopulacional. A definição do melhor número de grupos estruturados (K) será feita pelo método descrito por Evanno *et al.* (2005) no software Structure Harvester 0.6.92 (Earl & VonHoldt 2012). O software Clumpp v. 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) será usado para sumarizar as réplicas calculadas de cada K, e a representação gráfica dos resultados será realizada no programa Distruct v. 1.1 (Rosenberg, 2004).

f) Análises isotópicas

Isótopos estáveis são átomos de um mesmo elemento químico, porém com diferentes números de nêutrons presentes em seu núcleo, o que reflete em massas atômicas distintas (Peterson & Fry 1987). A razão entre átomos leves e pesados presentes em um tecido permite que a fonte utilizada para sua síntese seja rastreada. Os isótopos de carbono e nitrogênio são amplamente utilizados em Análises de Isótopos Estáveis (AIE) para demonstrar a fonte alimentar dos consumidores e o nível trófico tanto das presas como dos consumidores. Por isso a análise da composição isotópica é pertinente para avaliar fontes alimentares que participam da síntese dos tecidos dos consumidores, inferir sobre sua dieta e nível trófico, além de determinar a presença de subsídios de matéria alóctone incorporado aos tecidos.

Para a análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, serão coletadas amostras de 1 cm³ de músculo das aves mortas nas praias, 100 µl de sangue aves vivas, e 1 cm³ de músculo das potenciais presas das aves marinhas. As amostras de aves vivas serão obtidas por punção de veia tarsal, com auxílio de seringas e agulhas estéreis. As amostras de músculo de aves encontradas mortas nas praias serão coletadas com bisturis estéreis. As amostras de potenciais presas serão coletadas a partir do material regurgitado espontaneamente pelas aves, com auxílio de bisturis estéreis. Todas as amostras devem ser estocadas em microtubos e congeladas, sem adição de álcool. Todas as amostras devem ser enviadas para análise no Instituto de Ciências Biológicas da FURG.

Amostras de músculo terão os lipídios extraídos através do aparato de Soxhlet, segundo a metodologia empregada por Mancini & Bugoni (2014). Em seguida, as amostras de músculo e sangue serão liofilizadas, homogeneizadas, pesadas (1 mg) e armazenadas em cápsulas de estanho. Todas as amostras serão enviadas para análise em Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica (IRMS) no Centro Integrado de Análises da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. O padrão utilizado para análise de carbono e nitrogênio será o belemnito PeeDee de Vienna (VPDB) e ar

atmosférico, respectivamente. A determinação dos valores será expressa por δ em partes por mil (‰), conforme a Equação 23, de Bond & Hobson (2012):

$$\delta^{15}\text{N ou } \delta^{13}\text{C (‰)} = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1$$

Equação 23

Em que, R é a razão isotópica representada por $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ para $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente.

Todas as análises estatísticas serão realizadas no software R (R Core Team, 2018). Serão testadas a normalidade e a homocedasticidade dos dados para todas as análises. Para testar o efeito do desastre (antes de Nov/2015 vs. depois de Nov/2015) sobre a variação da dieta nas aves marinhas será utilizado teste *t* usando a função “lm”, ou teste não paramétrico equivalente caso os dados não atendam aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, em ambiente R (R Core Team, 2018). Para identificar a origem e a contribuição relativa dos itens alimentares nos tecidos dos consumidores, utilizaremos modelos de mistura isotópicos bayesianos através do pacote SIAR (Parnell *et al.*, 2010). A seleção das potenciais fontes alimentares das espécies será feita com base nas amostras de regurgitados e de informações disponíveis na literatura. Fatores de discriminação trófica (TDF), referidos como ΔN para $\delta^{15}\text{N}$ e ΔC para $\delta^{13}\text{C}$, serão aplicados ao modelo para amostras de sangue de cada consumidor e o tipo de presa inserida no modelo.

Após análises iniciais dos modelos de mistura realizado com várias potenciais fontes alimentares, os itens serão selecionados conforme a menor correlação entre eles, como indicado pelo manual SIAR (Inger *et al.*, 2010). Itens alimentares que apresentarem valores isotópicos semelhantes e similaridade ecológica poderão ser agrupados (Phillips *et al.*, 2005). Dessa forma, obteremos o modelo de mistura que melhor se adequa a cada consumidor.

g) Análises toxicológicas

Serão coletadas amostras de penas e de sangue de *Sula leucogaster*, *Thalassarche chlororhynchus*, *Phaethon aethereus* e *Pterodroma arminjoniana* capturadas a bordo, em Abrolhos e em Trindade. As coletas de sangue serão realizadas por punção da veia braquial. No máximo 1% da massa corporal de sangue de cada ave deverá ser coletado, utilizando-se agulhas descartáveis acopladas a seringas. Além disso, serão coletadas manualmente de 4 a 5 penas por indivíduo. Das aves mortas presentes nas praias da região, serão coletadas durante as atividades do Programa de Monitoramento de Praias (PMP) amostras de penas, fígado, músculo, rim e ossos de duas espécies de aves, uma residente (*Sula leucogaster*) e uma migratória (*Thalassarche chlororhynchus*). As carcaças serão encaminhadas para necropsia, preparação das peles e tombamento em coleção científica na FURG. As amostras serão armazenadas em frascos de vidro, refrigeradas e transportadas até o Laboratório de Aves Aquáticas e Tartarugas Marinhas, onde serão armazenadas em ultrafreezer até a realização das análises. Serão analisados os metais/elementos-traço Hg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd e As. Além destes, serão analisados contaminantes orgânicos persistentes organoclorados, organobromados e

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. As análises de contaminantes seguem as metodologias descritas no Anexo 1.

As amostras de material biológico para análises de metais/elementos-traço, com exceção do Hg, serão determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (AAS), por meio de espectrômetro equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Para a determinação do Hg, será utilizada o método de vapor a frio, com geração de hidretos acoplado ao espectrofotômetro de absorção atômica. As amostras biológicas serão secas em estufa (45-60°C) até peso seco constante. Posteriormente, serão digeridas em ácido nítrico na porção de 1g de peso seco de material biológico para 2mL de ácido nítrico. As amostras serão submetidas à digestão ácida lenta em frascos devidamente lacrados e mantidos em estufa incubadora (45-60°C) até a digestão completa. Após, será acrescentada água Mili-Q até completar 1mL de volume total. As concentrações de metais/elementos-traço serão apresentadas em µg/g (mg/Kg) de peso úmido e µg/g (mg/Kg) de peso seco. Para aferição acurácia e exatidão das análises, “brancos” e materiais de referência certificados (DOLT-5: fígado de peixe; DORM-4: músculo de peixe; TORT-3: hepatopâncreas de lagosta) serão utilizados como controles analíticos de qualidade.

Para a determinação de organoclorados, serão realizadas extrações de material biológico seco em *sohxlet* utilizando-se mistura hexano e diclorometano (1:1; v/v). Os padrões internos de PCB 103 e PCB 198 serão adicionados às amostras, que terão seu volume final reduzido para posterior purificação com adição de H₂SO₄. O conteúdo lipídico das amostras será quantificado por gravimetria e as concentrações finais dos compostos organoclorados serão normalizadas a partir deste. As concentrações serão quantificadas em cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD). O controle de qualidade será feito por análises de “brancos” e de injeção randômica de padrões certificados de referência.

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

Alíquotas das amostras biológicas serão tratadas para análise de HPAs através da liofilização, pesagem e extração em *sohxlet* com metanol, com posterior saponificação por adição de hidróxido de potássio. Posteriormente, a amostra será transferida para um funil de separação, onde é adicionado hexano. O extrato de hexano é então separado, por agitação manual, e recolhido em novo balão volumétrico. O procedimento é repetido três vezes, recolhendo-se todo extrato de hexano e reduzido-o a cerca de 1mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos são, então, purificados por *clean up* em colunas de vidro. Em seguida, adiciona-se ao extrato reduzido o padrão interno em Turbo vap,

para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs dar-se-á por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC/MS).

Os dados gerados serão analisados estatisticamente, incluindo a análise de correlações entre os contaminantes, entre os contaminantes e os valores de isótopos estáveis, e da comparação das concentrações entre os tecidos, entre os momentos anterior e posterior ao rompimento da barragem, e entre as idades e sexos das aves. Serão utilizados diversos testes, incluindo análise através de Modelos Lineares Generalizados (GLMs), que integram o conjunto de variáveis listado acima e sua influência sobre as concentrações de cada contaminante.

4.6.3. Cetáceos

a) Monitoramento por ponto fixo

Para a análise dos dados, a frequência de cetáceos e seus padrões comportamentais observados serão analisados através de teste não paramétrico Kruskal-Wallis. As seguintes variáveis serão avaliadas de acordo com cada ponto de observação, localidade e variação da maré: média de cetáceos observados por hora, tamanho e composição do grupo (adultos e imaturos), status de comportamento. Para as análises comparativas, serão considerados também fatores de “interferências” como escala Beufort e fluxo de embarcações. Para a exposição dos resultados serão utilizados gráficos e tabelas.

b) Monitoramento embarcado

Será realizada a plotagem em mapas georreferenciados dos grupos de cetáceos observados na foz do rio Doce durante o monitoramento embarcado. As coordenadas geográficas de observação dos grupos serão integradas a um Sistema de Informações Geográfica (SIG) por meio de software livre através de diferentes camadas dos dados espaciais obtidos tais como linhas de transecção, profundidade, dentre outros.

Serão realizados cálculos de estimativas de densidade e abundância utilizando o programa *Distance*. De acordo com Buckland et al. (2001), é necessário um número mínimo de detecções (observações) para se obter estimativa de densidade, cerca de 60 grupos. Já Williams & Thomas (2009) afirmam que até 18 grupos já foram usados em diversos casos. A taxa de encontro funciona como um índice de abundância, que reflete a abundância real das espécies em uma determinada área. Esse cálculo é feito dividindo-se o número de indivíduos/grupos pelo esforço amostral. A taxa de encontro será realizada de forma independente de se estimar a densidade.

c) Diversidade genética de cetáceos

Os tecidos coletados serão utilizados em análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES (São Mateus), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Para a extração do DNA será utilizado o método de solução salina em que, um pequeno pedaço de músculo será picotado e colocado em um microtubo no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações, será obtido a solução contendo o DNA extraído. Ao final do processo o DNA será ressuspendido com a adição de 20 μ L de ddH₂O e armazenado na geladeira a 4°C. Em seguida, as amostras de DNA serão quantificadas em espectrofotômetro.

Em seguida o DNA será amplificado por PCR (Polymerase Chain Reaction). Após a amplificação dos fragmentos, as reações serão purificadas utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Cada amostra será submetida a reações de sequenciamento nos dois sentidos para avaliação de marcadores mitocondriais e genotipagem para avaliação de marcadores nucleares (microsatélites).

As sequências mitocondriais serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Robert 2004) por meio do programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013). Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier et al. 2010) serão calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações.

As redes de haplótipos serão construídas com cálculos de Median-Joining no programa Network (Bandelt et al. 1999)

Para as análises dos microsatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) e os genótipos dos indivíduos avaliados serão comparados para os locos de microsatélites a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos.

O desequilíbrio de ligação entre os locos será verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg serão testados por meio do software Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010). Os locos também serão testados quanto à presença de alelos nulos, abandono de alelos e erros devido à presença de picos stutter utilizando-se o programa Microchecker v.2.2.0.3 (Van Oosterhout et al. 2004), com correção de Bonferroni.

Para as análises intrapopulacionais serão calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001) e Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2010).

Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de Bottleneck (efeito gargalo) será realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional será realizada uma análise de cluster bayesiana a fim de se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos microsatélites e dos locais de coleta utilizando o software Structure v.2.3.2 (Pritchard et al. 2000). Após a alocação dos indivíduos em cada cluster, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.11. Também serão calculados os índices

de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Valores de P serão considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

Será feita também a sexagem molecular dos indivíduos não necropsiados. Os animais que não forem recolhidos, mas tiverem uma amostra de tecido recolhida na praia, terão o sexo definido via PCR. Os primers a serem utilizados serão ZFX0582, ZFX0923 (Bérube & Palsboll, 1996), PMSRYF (Richard et al. 1994) e TtSRYR (Rosel et al. 2003). As reações de PCR serão confeccionadas com: Tampão 10x, 150 μ M de dNTP, 1,5 u de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,3 μ M de cada primer, com exceção do reverse para o SRY que será aplicado 0,06 μ M. O volume final será de 25 μ L. A amplificação será realizada nas seguintes condições: 92°C por 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg e 72°C por 45 segundos. Os fragmentos serão separados em gel de agarose 2,5%, corado com gel red. A corrida eletroforética será realizada a 120 V por 2 horas. A visualização das bandas será realizada com o auxílio de luz UV e estas serão fotografadas.

d) Análise histopatológica e microbiológica

Após a fixação dos tecidos, inclusive dos corações, estes, serão pesados em balança digital de precisão. A seguir todas as amostras serão clivadas em fragmentos menores de até 2-3 mm de espessura e acondicionadas em histossetes plásticos para posterior processamento em processador automático onde serão desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 90% e os seguintes em álcool absoluto, com duração de uma hora cada. Seguido da clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de uma hora cada e embebição por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em seqüência o material será incluído no próprio histossete em que foi acondicionado.

Após a solidificação, os blocos serão resfriados e cortados em seções de 5 μ m de espessura, em micrótomo semi-automático. Os cortes serão colocados em banheira histológica, de onde serão coletados por lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica. Ainda, outras histotécnicas especiais poderão ser empregadas, para posterior observação pela microscopia óptica e análise de imagens com auxílio de um programa de morfometria digital (Software Image J, versão 1.33).

As fotomicrografias obtidas serão documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital, adaptada em microscópio óptico.

Para a microbiologia, no laboratório, as amostras serão semeadas e processadas em meios de cultura (caldos e/ou em agar), como agar sangue, agar macconkey, agar saboraud, agar mueller hinton, entre outros, para o crescimento de micro-organismos patogênicos. Posteriormente, as amostras serão incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano serão repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas

através de métodos de coloração específica. Após esse processo, será feita a identificação microbiana, com a realização de análises por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. A seguir, com os micro-organismos identificados, serão realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas para posterior confecção dos laudos.

e) Análise de contaminantes (ecotoxicologia) dos cetáceos

As análises de contaminantes serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a determinação da concentração de mercúrio total (HgT), alíquotas de aproximadamente 0,3g de músculo, fígado e rim das amostras frescas enviadas serão atacadas a frio com 1mL de H₂O₂. Após essa etapa, será adicionado 5mL de solução sulfonítrica concentrada (H₂SO₄-HNO₃) v/v, seguindo por aquecimento em banho-maria a 60°C por 2 horas até a solubilização completa da amostra. Os extratos serão resfriados por quinze minutos, sendo adicionado 5mL de KMnO₄ (5%). As amostras retornarão ao banho-maria (60°C) por quinze minutos, e serão resfriadas, repousando por uma noite. No dia seguinte, o extrato será reduzido com a adição de 1mL de cloridrato de hidroxilamina (HONH₂), 12%. O extrato final será avolumado com água Milli-Q até 14mL. As determinações serão realizadas usando um Espectrofotômetro de Absorção Atômica com gerador de vapor frio (Malm et al. 1989; Bastos et al. 1998). A certificação do método de determinação do HgT será feita por meio de materiais certificados DOLT-5 (fígado de Dogfish) e DORM-2 (músculo de Dogfish) do National Research Council do Canadá. Todas as amostras serão analisadas em duplicata e serão usados brancos analíticos em todas as baterias.

Para a determinação das concentrações de elementos-traço (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, As), alíquotas de aproximadamente 0,2g de músculo, fígado e rim serão colocadas em tubos com tampa. A digestão das amostras será realizada através da adição de 2mL de ácido nítrico concentrado (65%), que vai agir *overnight*. No dia seguinte, as amostras serão colocadas em banho-maria a 60°C por 2 horas (Dorneles et al., 2007; Lailson-Brito et al., 2012). Após o resfriamento das amostras, a determinação das concentrações dos elementos será realizada utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS) equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman. Uma solução de nitrato de paládio (Pd(NO₃)₂), preparada a partir de uma solução padrão (Merck No.B9366989 710), será utilizada como modificador químico. O controle de qualidade será efetuado através do uso de materiais certificados de referência do USA National Institute of Standards and Technology e/ou do National Research Council do Canadá.

Para a determinação de compostos organoclorados, as extrações serão realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60mL e balões volumétricos de 125mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes será hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Será utilizado cerca de 1g de gordura. Serão adicionados às amostras os padrões internos PCB 103 e PCB 198. O volume final será reduzido para prosseguir à etapa de purificação com a adição de H₂SO₄ (Santos-Neto et al., 2014). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria (Lailson-Brito et al., 2007) e

as concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os pesticidas e as bifenilas policloradas serão mensuradas em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com detector de massas (MS) ou de captura de elétrons (GC/ECD). O hidrogênio será utilizado como gás de arraste e o nitrogênio como gás auxiliar (make up). O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões e brancos de solventes.

Para a determinação de compostos organobromados, as extrações serão realizadas com aparelhos de soxhlet com capacidade de 60mL e balões volumétricos de 125mL aquecidos individualmente por mantas aquecedoras. A mistura de solventes será hexano e diclorometano (1:1) (v/v). Será utilizado cerca de 1g de gordura. Será adicionado à amostra o padrão interno PBDE-181. O volume final será reduzido para prosseguir à etapa de purificação (Alonso, 2012). O conteúdo lipídico será quantificado por gravimetria (Lailson-Brito et al., 2007) e as concentrações finais serão corrigidas a partir do uso da massa de lipídios. Os PBDEs e MeO-PBDEs serão mensurados em um cromatógrafo de fase gasosa (GC) com espectrômetro de massa (MS). O GC operará no modo de ionização química negativa (ECNI). O metano será utilizado como gás de apoio do detector e as temperaturas de fonte de íons, quadrupólo e interface serão ajustadas para 230, 150 e 300°C, respectivamente. O MS será utilizado no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) com íons $m/z = 79$ e 81 (de tri- a hepta-BDEs) monitorados durante toda a corrida. O controle de qualidade será realizado através de análises regulares dos brancos de procedimentos, bem como através de injeção randômica de padrões e brancos de solventes.

A metodologia de análise de HPAs será adaptada e otimizada a partir de procedimento descrito pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, Environmental Protection Agency) e em Barros (2014). Resumidamente, alíquotas das amostras liofilizadas serão pesadas e extraídas em Soxhlet com metanol, seguidas pela reação de saponificação através da adição de hidróxido de potássio. Posteriormente será conduzida uma extração líquido-líquido com hexano, onde a amostra será transferida para um funil de separação, onde será adicionado hexano e através de agitação manual o extrato de hexano separado e recolhido em novo balão. Tal procedimento se repetirá 3 vezes e todo o extrato de hexano recolhido será então reduzido a cerca de 1mL em evaporador rotativo a vácuo. Os extratos serão purificados através do clean up, realizado em colunas de vidro. Ao extrato reduzido em Turbo vap será adicionado o padrão interno, para a quantificação dos compostos. A identificação e quantificação dos HPAs será realizada por CG-MS.

Recursos materiais: sistema de produção de água ultra pura, espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica, banho-maria, espectrômetro de absorção atômica com geração de vapor frio, sistemas de condensadores acoplados a soxhlet, rotoevaporador, centrífuga, miniconcentrador/evaporador de nitrogênio, cromatógrafo de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas e ao injetor automático; cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura de elétrons, com fonte radioativa de ^{63}Ni , acoplado ao injetor automático, além de reagentes (e.g.: hexano, diclorometano, ácido sulfúrico, ácido nítrico, cloridrato de hidroxilamina, entre outros)

padrões internos e padrão cromatográfico, materiais certificados de referência, luvas, vidraria (e.g: bequeres, tubo de ensaio, proveta, pipetas volumétricas, balão volumétrico, entre outros), tubos falcon, micropipetas, funil de separação, colunas grossa e fina, entre outros.

f) Ecologia trófica de cetáceos a partir de isótopos estáveis

Essas análises serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores (MAQUA) da UERJ.

Para a análise dos isótopos estáveis ^{13}C e ^{15}N , serão retiradas alíquotas de músculo dos cetáceos e das suas presas preferenciais na costa do Espírito Santo. Já existem informações sobre os itens mais frequentes na dieta das principais espécies ocorrentes na região (Di Benedetto et al. 2004, Di Benedetto et al. 2009, Cremer et al. 2012, Lopes et al. 2012, Girundi 2013, Pansard et al. 2010, Rodrigues, 2014). As amostras coletadas serão congeladas e enviadas para a UERJ para análise.

Após a secagem a 60°C por 72 h, as amostras serão maceradas até a obtenção de um pó homogêneo. Cerca de 1,5 mg de amostra será pesada em cápsula de estanho. A determinação da composição isotópica dos elementos será feita em um espectrômetro de massa DELTA V acoplado a um analisador elementar para C e N (Flash HT Plus). As razões isotópicas são expressas pela notação delta em partes por mil, de acordo com: $\delta X = [(Ramostra/Rpadr\tilde{a}o) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. As razões isotópicas do carbono e nitrogênio são expressas em relação ao padrão V-PDB (Vienna Peedee Belemnite) e ao nitrogênio atmosférico, respectivamente. Serão usados materiais certificados de referência em todas as análises. Devido à presença de lipídio ser variável nos tecidos de animais e por apresentar valores depreciados em ^{13}C em relação a todo o corpo (Peterson & Fry, 1987), será calculado a relação C:N para verificar o conteúdo lipídico de cada amostra (Post et al., 2007). Caso parte das amostras apresente relação C:N maior do que 3,5, será feita a normalização matemática dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$, segundo a equação: $\delta^{13}\text{C}_{normalizado} = \delta^{13}\text{C}_{sem\ tratamento} - 3,32 + 0,99 \times \text{C:N}$ (Post et al. 2007).

g) Análises reprodutivas e de determinação de idade em cetáceos

As análises de determinação de estágio reprodutivo e de idade serão realizadas no Laboratório de Mamíferos Aquáticos e Bioindicadores da UERJ.

A idade dos odontocetos é estimada a partir da contagem dos grupos de camadas de crescimento (GLGs, Growth Layer Groups), depositados na dentina e/ou cimento do dente desses animais (Perrin & Myrick, 1980). A determinação da idade será realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinedo & Hohn (2000).

Para isso, dois dentes de cada indivíduo serão colocados em cassetes histológicos, previamente identificados, e em seguida imersos em um agente descalcificante comercial (RDO®) até a completa descalcificação.

Após essa etapa, serão realizados cortes longitudinais, seguindo o plano antero-posterior, com cerca de 25 micrometros em um micrótomo de deslizamento acoplado a um sistema de congelamento.

Em seguida, os cortes provenientes da porção central do dente serão colocados novamente em um cassete histológico para a coloração com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Finalmente, os cortes corados serão colocados em uma lâmina contendo glicerina 100%, cobertos com uma lâminula e selados com Entellan. As leituras serão realizadas em microscópio óptico por dois leitores independentes sem acesso aos dados biológicos dos animais.

Para as análises reprodutivas, as gônadas serão coletadas, pesadas e medidas. Posteriormente serão fixadas e mantidas em formalina 10% até o momento das análises. Um fragmento da região central do testículo contendo 1 cm³ será embocado em parafina de acordo com o protocolo definido por Becak & Paulete (1976). Em seguida, os blocos serão seccionados em fatias de 6 micrometros em um micrótomo rotativo. Por fim, as secções serão coradas com hematoxilina-eosina para à confecção das lâminas permanentes.

As leituras serão realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x. A maturidade será avaliada com base na presença de espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos. Além disso, o diâmetro do túbulo seminífero e do tecido intersticial também serão avaliados para a determinação da maturidade sexual (Hohn et al., 1985).

Os ovários serão inspecionados externamente a fim de averiguar a presença de corpus lúteo e/ou corpus albicans, estruturas essas que indicam a maturidade sexual. Após inspeção, serão realizadas secções de 3 mm para visualizar o interior do ovário e certificar de que todos os corpora e folículos resultantes da ovulação foram registrados. A determinação da maturidade sexual será baseada em Perrin e Donovan (1984) onde as fêmeas que não apresentarem corpus lúteo ou albicans serão consideradas imaturas enquanto as fêmeas com um ou mais corpora lúteo ou albicans em um ovário serão consideradas maduras.

h) Interação dos pequenos cetáceos com a pesca

Serão realizadas entrevistas, saídas com pescadores e avaliados vestígios de aparato de pesca nos animais encontrados mortos.

Serão escolhidos seis pontos de desembarque em comunidades pesqueiras. Num primeiro momento a equipe irá percorrer toda a área de estudo para conhecer o local e contatar as associações e colônias de pesca apresentando-se e fazendo um levantamento preliminar, com base nas informações das colônias e associações, do número atual de pescadores e embarcações existentes em cada comunidade.

Após a fase de levantamento preliminar iniciar-se-á a aplicação de um questionário pré-formulado Felix (2011) para os mestres das embarcações onde serão coletadas informações acerca do perfil dos pescadores e locais em que atuam, características da embarcação (dimensões, tripulação e autonomia), artefatos e técnicas utilizadas, etc. Embora o questionário seja elaborado de forma a

permitir a tabulação e análise dos dados, as entrevistas serão conduzidas de forma informal, através de um diálogo entre os agentes de campo e os mestres das embarcações, podendo este diálogo ser interrompido e retomado em outro momento até que toda a informação necessária seja coletada. Estes diálogos poderão ser gravados ou não, dependendo da anuência do entrevistado. Nesta etapa quando autorizado, serão fotografados os tipos de embarcação e apetrechos de pesca utilizados.

Nesta primeira fase as entrevistas terão como foco as atividades de pesca em si, não sendo trabalhada diretamente a questão das capturas, embora este assunto possa surgir de forma espontânea durante a entrevista. As comunidades serão visitadas regularmente.

Ao final pretende-se ter informações a respeito de avistamentos, ocorrência de capturas acidentais de cetáceos e das características dos artefatos pesqueiros (tipo de rede, malha, etc.).

Os questionários aplicados serão agrupados, de acordo com as respostas obtidas, evidenciando as convergências de informações sobre os diversos temas abordados.

4.6.4. Tartaruga Marinhas

a) Saúde das tartarugas marinhas

Hemogramas: Os hemogramas serão realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A metodologia será a clássica manual descrita em CAMPBELL (2015) que basicamente consiste da determinação do hematócrito (HTC) será realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm em centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos será realizada em câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) será feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da reação para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 µl de sangue total com 2,5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540nm (SANTOS et al. 2009). A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias será realizado o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

A contagem diferencial dos leucócitos será feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido®. Serão contadas 100 células para diferenciação leucocitária (SANTOS et al. 2009).

Análises bioquímicas: Será analisado um perfil bioquímico plasmático de 20 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina-globulina, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, relação cálcio-fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As

análises serão realizadas no sistema automatizado Beckman Coulter AU2700, ou similar utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante (SANTOS et al 2015).

As análises toxicológicas de contaminantes orgânicos e metais serão realizadas na FURG e estão descritas no protocolo do Anexo 1.

b) Diversidade genética das tartarugas marinhas

Serão utilizadas as amostras de tecido coletadas das tartarugas marinhas encontrados em áreas de desova (Povoação), área de alimentação (APA Costa das Algas) ou enclachados nas praias do Espírito Santo (assim que houver o acordo da Fundação Renova com o PMP). Serão avaliados os indivíduos encontrados durante o período do estudo, bem como, de períodos anteriores já publicados para comparações (Vargas *et al.* 2008, Vargas *et al.* 2013 e Shamblin *et al.* 2014).

Os tecidos para as análises genéticas serão armazenados em microtubos e conservados em etanol absoluto e serão depositados no Laboratório de Genética e Evolução Molecular da UFES (LGEM-UFES). Os processos laboratoriais e análises serão realizados no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) e no LGEM, do CCHN (Vitória), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES):

Extração e quantificação do DNA: Um pequeno pedaço de músculo ou biópsia de pele das tartarugas marinhas será picotado e colocado em um microtubo, no qual, com o auxílio de reagentes e centrifugações será realizada a extração do DNA pelo método de solução salina descrito por Bruford et al. (1992). Ao final do processo o DNA será ressuspensionado com a adição de 50 µL de ddH₂O e armazenado na geladeira a 4°C. As amostras de DNA serão quantificadas em espectrofotômetro. O DNA extraído será quantificado utilizando-se o equipamento NanoDrop™.

Amplificação por PCR e sequenciamento: Cada amostra será submetida à reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador ABI Veriti® com combinações específicas de primers para isolar e amplificar a região controle do DNA mitocondrial das tartarugas marinhas e até 15 loci de microssatélites do DNA nuclear dependendo da espécie. Para genotipagem dos microssatélites, será adicionada nas reações um multiplex com padrão de tamanho fluorescente GeneScan500 Biosystems e fluorescências de cores distintas para serem posteriormente lidas e interpretadas no sequenciador automático.

O sucesso da amplificação será verificado utilizando-se 1 µl do produto de PCR misturados com 1 µl de BlueJuice® (Invitrogen, EUA) submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % a 100 V por 35 minutos. Será utilizado o corante intercalante de DNA GelRed® (Biotium) para visualizar os fragmentos de DNA sob incidência de luz ultravioleta em um Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch® (Loccus). Todas as PCR serão feitas acrescentando água Mili-Q como controle negativo em sala isolada (pré-PCR) e as misturas de PCR realizadas em uma capela previamente esterilizada com hipoclorito de sódio 10% e álcool 70%, onde nenhum DNA é manipulado.

Os produtos de PCR do marcador mitocondrial serão purificados utilizando-se a enzima ExoSap-IT (USB Corporation). Todos os fragmentos serão sequenciados ou genotipados no sequenciador automático Applied Biosystems ABI3500 do NGACB-UFES. Os picos dos alelos serão analisados no Programa Geneious®.

Análise dos dados genéticos: As sequências da região controle do DNA mitocondrial serão alinhadas com o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) por meio do programa MEGA 10. Por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.* 2010) serão calculados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (H) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre diferentes localidades, baseada no FST com 1000 permutações. As redes de haplótipos serão construídas com cálculos de Median Joining no programa Network.

Para as análises dos microssatélites, os locos serão identificados com o software GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems). A probabilidade de não-exclusão para identidade dos indivíduos será estimada utilizando o software Cervus v.3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007). Os genótipos dos indivíduos avaliados serão comparados para os locos de microssatélites com o programa Mstools v. 3.1 (Park, 2001) a fim de se verificar a presença de genótipos idênticos. O desequilíbrio de ligação entre os locos será verificado com o programa GENEPOP on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg serão testados por meio do software Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.* 2010). Os locos também serão testados quanto à presença de alelos nulos.

Para as análises intrapopulacionais serão calculados os índices de diversidade genética com os programas Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001) e Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.* 2010). Para verificar eventos de gargalo populacional passado ou recente um teste de ocorrência de Bottleneck (efeito gargalo) será realizado utilizando o software Bottleneck v. 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Para determinar provável estrutura populacional será realizada uma análise de cluster bayesiana a fim de se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos microssatélites e dos locais de coleta utilizando o software Structure v.2.3.2 (Pritchard *et al.* 2000). Após a alocação dos indivíduos em cada cluster, será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa Arlequin v.3.5. Também serão calculados os índices de diferenciação genética global entre as unidades de população (FST), e índices de RST (estruturação da população), por meio dos programas Genepop on the Web (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) e Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001). Valores de P serão considerados significativos no nível de 0,01 ($P \leq 0,01$) e 0,05 ($P \leq 0,05$).

c) Remessa de amostras

As amostras de plasma, ovos e natimortos serão encaminhadas ao laboratório de referência (FURG) e deverão ser armazenadas em caixas de isopor contendo gelo seco e transportadas em caminhão frigorífico congeladas a -10 oC, sob responsabilidade da RDDM.

As amostras de tecidos para análise genética deverão ser encaminhadas em temperatura ambiente para o Laboratório de Genética e Evolução Molecular da UFES (LGEM-UFES).

As amostras de plasma para provas bioquímicas deverão ser enviadas congeladas em isopor com gelo reciclável para o IMD.

As amostras serão enviadas acompanhadas de uma lista com seus respectivos códigos de identificação para verificação no destino. Qualquer incoerência deve ser informada ao escritório de projetos e ao IMD.

4.7. ANEXO 7 - MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA DULCÍCOLA, MARINHA E ESTUARINA

4.7.1. Sistema aquático dulcícola

Após a coleta, as amostras de tecidos serão recebidas no Laboratório de Genética e Evolução Animal da Universidade Federal do Amazonas. As mesmas serão armazenadas em freezers na Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade.

a) Extração de DNA

O DNA genômico será extraído com a utilização de kits de Extração de DNA. O procedimento consiste de digestão do tecido em tampão de lise e filtragem do DNA em colunas de sílica, seguindo o protocolo do fabricante.

b) Desenvolvimento de primers para microsatelites

- Enriquecimento do DNA

Será feito um pool de DNA de 10 indivíduos da cada espécie. Posteriormente o DNA será enriquecido para elementos repetitivos usando sondas específicas.

- Construção da biblioteca genômica

A biblioteca genômica será construída a partir do pool do DNA enriquecido, usando Kits com adaptadores com barcodes, e sequenciado na plataforma Illumina (serviço no exterior).

- Desenho de primers para microsatelites

Após o sequenciamento da biblioteca genômica, será feita a montagem dos contigs. Os contigs serão filtrados para identificação de elementos repetitivos e regiões flanqueadoras longas suficiente para permitir o desenho dos primers. Nos primers escolhidos (no mínimo 20 primers por espécie) serão adicionados caudas que diferenciarão entre os primers forward e reverse, (serviço no exterior).

- Caracterização dos primers para microsattelites

Os 20 primers serão caracterizados numa amostra de 10 indivíduos de cada espécie. Serão selecionados os 10 melhores primers (considerando consistência da amplificação, maior numero de alelos, maior grau de polimorfismo, etc.) e estes serão então usados nas análises populacionais.

c) Desenvolvimento de primers para genes mitocondriais e nucleares

- Desenho de primers

Usando o banco de dados de genes disponíveis no Genbank e no BOLD dos peixes do rio Doce e outros rios do Nordeste, Centroeste, Sudeste e Sul do Brasil, serão desenhados primers para dois (2) genes mitocondriais e dois (2) genes nucleares. Um desses genes mitocondriais será o Citocromo Oxidase I (o DNA barcode). Os tamanhos máximos dos primers serão de 300 bp, e devem se sobrepor dentro uma região gênica. Serão adicionados caudas que diferenciarão entre os primers forward e reverse, (serviço no exterior).

d) Amplificação dos microsatelites

- PCR

Para cada indivíduo e para cada par de primers será feita amplificação via PCR usando protocolos padrão.

- Labeling de PCR com adaptadores com barcodes

Será feito um pool de todos os PCRs feitos para cada indivíduo, e aos mesmos serão adicionados adaptadores para sequenciamento no IonTorrent PGM. Os adaptadores tem barcodes específicos, e assim tem como identificar cada indivíduo por uma combinação única de barcodes.

e) Amplificação dos genes mitocondriais e nucleares

- PCR

Para cada indivíduo e para cada par de primers será feita uma PCR usando protocolos padrão de amplificação.

- Labeling de PCR com adaptadores com barcodes

Será feito um pool de todos os PCRs feito para cada indivíduo, e aos mesmos serão adicionados adaptadores para sequenciamento no IonTorrent PGM. Os adaptadores têm barcodes específicos, e assim tem como identificar cada indivíduo por uma combinação única de barcodes.

f) Sequenciamento no IonTorrent PGM

- Preparo e sequenciamento da biblioteca genômica

Será feito um pool de 240 indivíduos (todos os microsatelites ou todos os genes), cada um deles individualizado via uma combinação única de barcodes. Esse pool equimolar será submetido à amplificação clonal. A biblioteca será posteriormente purificada, e carregada no Chip 318. O Chip 318 será aplicado no IonTorrent PGM onde procede o sequenciamento NGS.

g) Processamento de dados

- Demultiplexação

Os dados brutos de sequencias serão baixados do servidor do IonTorrent PGM, e demultiplexados (individualizados conforme a combinação única dos barcodes). Posteriormente serão removidos os adaptadores, barcodes e primers de amplificação.

- Separação dos locos microsatelites

Os locos de microsatelites específicos serão identificados através das regiões flangeadoras dos elementos repetitivos, e separados por microsatelites. A partir dessas leituras serão identificados os alelos presentes em cada indivíduo para cada microsatelite. Os resultados serão registrados em um banco de dados de genótipos.

- Separação dos locos gênicos

As sequencias serão montadas nos contigs representando os genes completos amplificados. Os genes específicos serão identificados através da similaridade com sequencias de referência, e serão registrados em um banco de dados de sequencias.

- Montagem de bancos de dados para analises

A partir dos bancos de dados dos microsatelites e das sequencias, serão então gerados os arquivos de entrada nos formatos específicos para cada tipo de programa/analises.

h) Analise de dados

- Estimativa da diversidade genética

As estimativas de diversidade genética serão determinadas analisando as taxas de diversidade haplotípica - h (NEI, 1987), diversidade nucleotídica - π (NEI, 1987), AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992), endogamia e estruturação populacional - ϕ_{ST} (EXCOFFIER et al., 1992) e ocorrência de eventos de gargalo populacional, entre outros, sendo definido para tal os softwares ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2010), DNASP 5.4 (ROZAS et al., 2003) e BOTTLENECK (CORNUET & LUIKART, 1996).

- Estimativa das frequências alélicas

As frequências alélicas e o número de alelos efetivos e privados serão obtidos através do software PopGene v3.3 (RAYMOND & ROUSSET, 1995). O mesmo software deverá ser utilizado também para os cálculos de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e).

- Estimativa das estatísticas da composição de nucleotídeos e padrões de substituições

A composição de nucleotídeos e padrões de substituições de bases nucleotídicas das sequências serão feitas através do software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013).

- DNA barcoding

Códigos de barra de DNA (DNA barcode) serão determinados para pelo menos cinco indivíduos de todas as espécies coletadas em cada um dos pontos de coleta. As sequências obtidas serão submetidas ao banco de dados BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) (RATNASINGHAM & HEBER, 2013) para verificar a correspondência e similaridade com as sequências lá armazenadas.

A divergência genética entre as sequências será inferida através da aplicação do algoritmo Kimura- 2-parametros, K2P (Kimura, 1980) e, a identificação de Barcode gap e o Barcode Index Number (RATNASINGHAM & HEBERT, 2013) serão conduzidas no próprio site do Barcoding of Life (<http://www.barcodeoflife.org/>).

4.7.2. Sistema aquático marinho

a) Peixes e crustáceos estuarinos/marinhos

Os peixes e crustáceos que serão coletados através de redes de arrasto de fundo com portas (redes “balão”) serão armazenados sob refrigeração (caixa isotérmica com gelo ou congelador, dependendo da disponibilidade) até o momento do desembarque. No desembarque, a lista de amostras (Quadro 50) será conferida de acordo com a data de coleta, área, ponto e arrasto, sendo que a unidade amostral será cada arrasto. A área será nomeada de acordo com o rio da proximidade (do Sul para o norte: Piraquê-Açu (apenas peixes), Doce, Ipiranga, São Mateus e Caravelas).

Quadro 50. Exemplo de lista de conferência de amostras de peixes e crustáceos coletados para o estudo e monitoramento da ictiofauna marinha (TR 4 – Anexo 7)

Responsável :				
DATA	AREA	PONTO	ARRASTO	conferido
		1	1	
		1	2	
		1	3	
		2	1	
		2	2	
		2	3	
		3	1	
		3	2	
		3	3	
		4	1	
		4	2	
		4	3	

DATA	AREA	PONTO	ARRASTO	conferido
		5	1	
		5	2	
		5	3	
		6	1	
		6	2	
		6	3	

No laboratório de destino, as amostras serão recebidas pelo técnico responsável, que conferirá a amostra quanto a sua correta identificação bem como, correto acondicionamento (integridade dos sacos plásticos, legibilidade das etiquetas, etc.). A seguir as amostras serão armazenadas em câmara fria/freezer (-20°C) até o momento do processamento.

- Identificação

Para o processamento, cada amostra será descongelada separadamente, evitando que os arrastos se misturem. A seguir, peixes e crustáceos serão identificados no menor nível taxonômico possível, utilizando-se bibliografia disponível da seguinte forma:

- peixes estuarinos/marinhos: Figueiredo e Menezes (1978), Menezes e Figueiredo (1980), Rivas (1986), Cervigón (1996), Marceniuk (2005), Kullander e Ferreira (2006), Moura e Lindeman (2007), Marceniuk *et al.* (2012), Loeb (2012), Menezes *et al.* (2015), entre outros;

- Crustáceos estuarinos/marinhos: Melo (1996); Melo (1999); Costa *et al.* (2003); Braga *et al.* (2005), entre outros.

- Biometria

Após identificação, será realizada a biometria de cada peixe. Peixes ósseos e crustáceos serão pesados o mais próximo de 0,01g; os elasmobrânquios, o mais próximo de 0,1kg ou 0,1g, dependendo do tamanho. Empregando um ictiômetro, os peixes serão mensurados da seguinte forma:

- Raias: comprimento total - CT (extremidade do focinho a extremidade da nadadeira caudal); comprimento do disco – CD (extremidade do focinho até a extremidade posterior da nadadeira peitoral); e largura do disco – LD (comprimento entre as extremidades das nadadeiras peitorais);

- Tubarões/cações: comprimento total – CT (extremidade do focinho a extremidade da nadadeira caudal); e distância interdorsal – DI (distância entre a inserção da 1ª nadadeira dorsal e a margem anterior da 2ª nadadeira dorsal).

- Peixes ósseos: comprimento total – CT (em mm, o comprimento da extremidade do focinho a extremidade da cauda) e o comprimento padrão – CP (em mm, o comprimento da extremidade do

focinho a extremidade posterior da coluna vertebral). Utilizando-se uma balança, os mesmos serão pesados (P, o mais próximo de 0,01g).

- Camarões: com auxílio de paquímetro (o mais próximo de 1mm), dos camarões serão mensurados o comprimento da carapaça – CC (da região intraorbital à margem posterior) e o comprimento total – CT (da região da extremidade do rostro até a extremidade do telson).

- Siris/caranguejos: comprimento da carapaça – CC (do rostro à margem posterior da carapaça entre os últimos espinhos) e a largura da carapaça – LC (das margens da carapaça entre os últimos espinhos laterais). Nos caranguejos, LC e CC serão medidos na porção mediana da carapaça, tanto longitudinalmente quanto transversalmente.

Peixes e crustáceos cuja abundância seja maior que 30 indivíduos/espécie em um único arrasto, será retirada uma subamostra aleatória de 30 indivíduos para biometria (pesagem e mensuração). Para a aleatorização da amostragem, todos os indivíduos da citada espécie serão organizados em bandejas e numerados. Depois, será criada uma planilha no Excel, na qual cada linha da primeira coluna corresponderá a um indivíduo (p. ex. Linha 1 = indivíduo 1; linha 2 = indivíduo 2...linha 100 = indivíduo 100). Na segunda coluna, cada linha receberá um número aleatório (gerado na aba Fórmulas> Matemática e trigonometria>Aleatório), que posteriormente será ordenado em ordem crescente. Por fim, os indivíduos correspondentes aos números das 30 primeiras linhas da primeira coluna, serão selecionados para biometria. Destaca-se que todos os indivíduos das amostras serão contados e pesados (peso total da amostra); a subamostragem será utilizada apenas para a descrição da estrutura de tamanho.

- Banco de imagens

Após a identificação, peixes e crustáceos devem ser fotografados com nome científico, escala e dados do exemplar (ID). O arquivo da imagem deve ter pelo menos 1MB ou mais, quando possível.

De cada espécie de peixe, 15 exemplares (quando capturados) serão fotografados. A câmera fotográfica será posicionada acima do exemplar, a cerca de 10cm de distância do mesmo. O peixe será posicionado com o focinho voltado para o lado esquerdo e a nadadeira caudal voltada para o lado direito, em fundo preto, utilizando uma escala em cm.

Os crustáceos serão fotografados de cima, em fundo preto, com escala em mm. Os camarões devem ser posicionados de lado, com a carapaça voltada para a esquerda, o corpo distendido (aproximadamente 150°) e as estruturas (olhos, antenas, apêndices locomotores) devem ser abertas e expostas. Nos caranguejos e siris, as quelas serão posicionadas para cima e, como os camarões, devem ter os apêndices abertos e expostos. As fotografias serão listadas por indivíduo, em ficha contendo nome da espécie e identificação do indivíduo quanto a procedência (data de coleta, área, ponto e arrasto).

O arquivo de cada imagem deverá ser nomeado da seguinte forma: em minúsculas, três primeiras letras do gênero + três primeiras letras da espécie + n° do exemplar (a partir de 02 algarismos)

iniciais da área (PA=Piraquê-Açu; IP=Ipiranga; SM=São Mateus; CA=Caravelas) + número do ponto (de 01 a 09) + número do arrasto (1, 2 ou 3) + data de coleta (formato DDMMAA, onde mês é em algarismos romanos), conforme exemplo abaixo:

LYCGRO-01RD01A3-12XII18

*chave=LYCGRO (*Lycengraulis grossidens*) – 01 = n° do exemplar, RD = Rio Doce, 01 = ponto, A3 = arrasto 3 – 12XII18 = 12 de dezembro de 2018

- Estudos dirigidos

Após a identificação, biometria e fotografia, peixes e crustáceos de espécies selecionadas de acordo com a abundância em estudos prévios em estuários próximos, terão removidas estruturas, da seguinte forma:

- Reprodução – peixes: através de uma incisão ventral, serão retiradas as gônadas dos peixes (quando visíveis), que serão pesadas (o mais próximo de 0,001g). Serão identificados sexo e estágio de maturação gonadal conforme Brown-Peterson *et al.* (2011). Em frasco devidamente identificado com a ID dos peixes, as gônadas retiradas serão fixadas em formalina 10% (24h) e após, conservadas em álcool 70%. As gônadas serão processadas no Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos – LEPM, do Centro Universitário Norte do Espírito Santo/Universidade Federal do Espírito Santo (quadros 3 e 4). Machos de elasmobrânquios serão caracterizados pela presença de cláspes e seus estádios de maturação serão caracterizados pelo tamanho e rigidez do mesmo (Stehmann, 2002);

- Microquímica de otólitos – peixes: através de uma incisão na porção antero-ventral do peixe, logo atrás da boca, serão retirados os otólitos para os estudos de microquímica. Os otólitos serão retirados e manipulados com pinças de plástico. A seguir, serão lavados com água e secos em papel toalha. Serão então armazenados em frascos plásticos secos devidamente etiquetados e armazenados até o processamento. Os otólitos retirados serão enviados à Universidade Estadual Paulista, campus Registro (Quadro 53 e Quadro 54). Todos os dados biométricos e das estruturas removidas serão anotados em ficha de triagem própria (anexos I a V);

- Reprodução – crustáceos:

- Camarões: o sexo será determinado, considerando os caracteres sexuais secundários: presença de telico nas fêmeas e petasma nos machos. Nos machos, o estágio de maturação será determinado pela união dos lóbulos do petasma conforme Pérez Farfante (1970), enquanto nas fêmeas será determinado pela coloração e desenvolvimento das gônadas, conforme Vieira (1947);

- siris/caranguejos: o estágio de maturação será determinado por observação da morfologia externa, de acordo com Haefner (1990). A fase de maturação morfológica dos jovens (imaturos) e adultos (maduros) será diferenciada pelo formato e aderência do abdome ao esternito torácico, considerando os juvenis os indivíduos que apresentarem o abdome selado. A determinação do sexo será feita com

base na observação macroscópica do abdômen (formato do abdome e número de pleópodos), da seguinte forma: fêmeas apresentam abdome arredondado com vários pleópodos, enquanto machos apresentam abdome em formato de “T” invertido, com dois pleópodos.

Testemunhos do estudo

Alguns exemplares de cada espécie de peixes e crustáceos serão selecionados para serem preservados para tombamento em coleção zoológica, até que se tenha representantes de todas as espécies amostradas. Peixes e crustáceos serão tombados na Coleção Zoológica Norte Capixaba do CEUNES/UFES e/ou na Universidade Federal de Viçosa.

b) Peixes recifais – comunidades e populações

Após a imersão, os dados de censo foram repassados para cadernos com finalidade de manter um arquivo físico destes dados, para posterior repasse em planilhas digitais.

As fotos retiradas foram baixadas e organizadas por pastas segundo os pontos amostrais (censos, setor e zona), data da amostragem e nome do fotógrafo. Cada foto foi tratada para o brilho e contraste, recortada segundo o tamanho do frame para posterior análise e identificação dos grandes grupos de organismos bentônicos do substrato. Para cada foto do foto-quadrado foi aplicado um conjunto de 30 pontos aleatórios, com auxílio do programa CPCe, sob o qual a espécie e/ou substrato foram identificados.

Os organismos bentônicos foram classificados nos seguintes grandes grupos: i) Corais; ii) Briozoários, iii) Alga calcária, iv) Cianobactéria, v) Turf (matriz de alga epilítica), vi) Esponjas, vii) Equinodermos e viii) Macroalgas (denominada “Algas”).

Após a análise das fotos no CPCe, os dados de porcentagem de cobertura por grupo bentônico foram exportados para uma matriz de Excel. O conjunto de 15 fotos compuseram a porcentagem de cobertura de um foto-quadrado, e a média de cobertura obtida pelos dois foto- quadrados de cada ponto fixo do censo representaram uma unidade amostral.

c) Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

- Genética de populações

As extrações de DNA de todos os organismos coletados nos meses de Outubro/2018 a Agosto/2019, foi realizada seguindo o protocolo modificado de solução salina (BRUFORD et al., 1992) que consiste na lise celular de 10mg de tecido em 600 μ L de Tampão TNES (Tris HCl 0,25M, NaCl 2M, EDTA 0,1M, SDS 2,5%, pH 8,0), e 5 μ L de proteinase-k para retirada de proteínas, incubados por 2 horas a 56°C em banho maria. Após esse período os tubos contendo o produto celular dissolvido são colocados em centrífuga por 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante do processo é repassado para um novo tubo e onde é adicionado 1000 mL de Isopropanol e mantido em congelador -80°C por 1 hora, com a intenção de obter o DNA genômico existente na amostra, para posterior centrifugação de 15 minutos a 14000 rpm. Para a limpeza do pellet de DNA e retirada de qualquer resquício de

proteína, 750 mL de Etanol a 70% gelado (-20°C) é adicionado seguido de uma centrifugação de 5 minutos a 14000 rpm. Deve-se retirar todo o álcool contido no tubo e manter os tubos abertos em estufa para que todo álcool seja evaporado. A diluição do DNA obtido é feita em 80 µL de TE e conservado a - 20°C até o momento da utilização do DNA.

Após a extração, as amostras foram avaliadas quanto à integridade e concentração de DNA no equipamento Qubit Fluorometric Quantitation, (ThermoFisher Scientific™). A estratégia de investigação dos genomas visa obter polimorfismos que permitam a análise refinada dos processos microevolutivos. Foram utilizados dois marcadores de alto nível de polimorfismo, um marcador genético da região controle do DNA mitocondrial (Dloop) e microsatélites presentes no DNA nuclear. Tais marcadores foram escolhidos devido seu custo médio para desenvolvimento, alta resolução, análise automatizada e disponibilidade de aplicativos computacionais para análise estatística.

As amplificações para obtenção da região do Dloop de cada espécie foram feitas pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Como não há iniciadores específicos descritos para algumas espécies utilizadas neste estudo, foram utilizados três pares de iniciadores descritos como Universais para peixes (Quadro 51).

Quadro 51: Iniciadores (primers) utilizados na otimização das reações de amplificação para a região controle do gene mitocondrial (Dloop), com as sequências correspondentes e autores

ID primer	Sequência	Autor
Marfish_Thr_F	5'-AGCACCGGTCTTGTAACCG-3'	Cheng et al. 2012
Marfish_Phe_R	5'-GGGCTCATCTTAACATCTTCA-3'	Cheng et al. 2012
SBL1	5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGKATTC -3	Santa Brígida et al 2007
SBH1	5'-TGTTTATCACTGCTGRRITCCCT -3'	Santa Brígida et al 2007
Dloop A _F	5'-TTCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG-3'	Lee et al., 1995
Perc 12S 1R	5'-GCGGATACTTGCATGTGTAA -3'	Santa Brígida et al 2007

As reações de PCR para peixes estuarinos utilizando marcadores mitocondriais foram realizadas com um volume final de 12,5 µl com 1X de PCR Buffer minus Mg, 0,2mM de cada dNTP, 2 µM de MgCl₂, 10µM primer F, 10 µM de primer R, 1µl de DNA template (50ng - 100ng) e 2 unidade de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®). Para os peixes recifais, as reações foram realizadas com um volume final de 12,5 µl com 1X de PCR Buffer minus Mg, 0,2mM de cada dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 10µM primer F, 10 µM de primer R, 1µl de DNA template (50ng - 100ng) e 1 unidade de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®).

Em termociclador foi realizada a amplificação das reações, seguindo os seguintes procedimentos: desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos (1x); 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 50-60° C (dependendo da espécie) por 45 segundos, e extensão a 72° C por 45 segundos finalizando com a extensão final à 72°C por 7 minutos e 4° C ∞ para conservar a

reação. As reações de PCR foram visualizadas em géis de agarose a 1,0% (0,1g de agarose/ 1ml de tampão TBE 1%), corados com Sybr safe e visualizados em fotodocumentador de luz UV.

Após a amplificação da região/fragmento de interesse, foi realizada a purificação do produto de PCR usando o protocolo de Dorado-Pérez (2012). Para a reação de sequenciamento (SANGER et al. 1977) foi utilizando o produto BigDye® Terminator v.3.1 Cycle sequencing Kit. As amostras de PCR são analisadas no aparelho Seqstudio (Thermo Fisher Scientific).

As amplificações da região microssatélite para sete espécies de peixes recifais e duas espécies de peixes estuarinos foram padronizadas a partir de 80 pares de iniciadores específicos, descritos na literatura para cada espécie de interesse, a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR). O quadro abaixo (Quadro 52) apresenta os iniciadores adquiridos, suas respectivas fluorescências, estrutura de repetição e referências bibliográficas.

Devido à ausência de primers específicos para a maioria dos peixes estuarinos do presente estudo, seis locos microssatélites estão em fase final de prospecção e também serão incorporados ao trabalho de caracterização genética, trazendo assim dados inéditos a respeito da diversidade dessas espécies.

Para a padronização dos 80 pares de marcadores apresentados no Quadro 2, a reação de amplificação apresentou 11,0 µL de volume final, contendo; 1X do tampão, 3,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 0,25 µM de cada primer (sendo o “forward” marcado com fluorescência), 1,0 unidade de Taq polimerase e 2,6 µL de água ultra pura. O restante do volume da reação de 11 µL foi completo com amostra de DNA, com concentração de 15 ng. A reação foi realizada em termociclador convencional, seguindo as condições: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 53°C a 58°C por 1 min, 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% para avaliar a amplificação e verificar o tamanho dos fragmentos baseados no marcador de 50kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Após a confirmação de amplificação, os produtos de PCR foram purificados a partir do protocolo de Dorado-Pérez (2012) e analisados em sequenciador automático SeqStudio (Thermo Fisher Scientific), com GeneScan 600 LIZ Size Standard (Thermo Fisher Scientific) e analisados através do programa GeneMapper v.5 (Thermo Fisher Scientific).

Quadro 52: Relação dos 80 locos de microssatélites adquiridos para caracterização da diversidade genética de peixes recifais e estuarinos

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Espécies Estuarinas		
<i>Lycengraulis grossidens</i>		
A4 F	F:(FAM)GCAGATCAGAGGGTTGGTTAG	(GT)14

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
A4 R	R:CAAAGAGACTCACAAAAATGTATGC	
C4 F	F:(FAM)TTTTGTAATGAAAGAGGCGTGT	(GT)8
C4 R	R:CAAGTCTTGACGTTAAATAGTGTGA	
C6 F	F:(FAM)TTGTGCGAGCTGAGGAGATGAC	(AC)29
C6 R	R:GGAGTCATCTGTTTGCCTGAT	
D4 F	F:(HEX)GGAGTGGGTAAGTGTGTG	(TG)17
D4 R	R:GTATCTTGAGCAATCCGTGCT	
D7 F	F:(FAM)AATCACATCGTGGCATGTGTA	(GT)37
D7 R	R:TGAGGAATCATTTCATCATCG	
D8 F	F:(HEX)TGTCAAACTGAATCCTGAATGTG	(TG)9
D8 R	R:ACACGCACAAGTAGACGGAAG	
D12 F	F:(NED)ACAAAAGCTTTGTCACCGAAG	(TG)28
D12 R	R:ATTTTACAGGGTGGAGCAGTG	
G8 F	F:(FAM)AACCAAACACCACATTTTCAG	(GT)25
G8 R	R:TGTAGAACACCCAACCAGGAG	
<i>Micropogonias furnieri</i>		
Mfur02 F	F:(HEX)TTTGAGTTGGATGGATGAGC	(CA)21
Mfur02 R	R:AGTGAGTTTAGAGGGTCTGC	
Mfur03 F	F:(FAM)ATGGAGCGATTAGGATGTGAAT	(CA)19
Mfur03 R	R:CTGAAATGACTGAATGAGGCTG	
Mfur06 F	F:(HEX)TTCACGTCTGTAGCTGTGTGTG	(TG)14
Mfur06 R	R:GGAGACATCTGCCTGTTGAAG	
Mfur07 F	F:(FAM)TGTAGCCTCGACCTGAAGTGTA	(GT)7
Mfur07 R	R:TGTGCTTAGAAACAAAGTAGCC	
Mfur08 F	F: (FAM) CACTTAACCGCATGTGGACCGA	(TG)22

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Mfur08 R	R:CTGTCCCTCGTTCTGTCTTCTT	
Mfur09 F	F:(FAM)AGGTACATTTAGGGTGGAGGGT	(TG)28
Mfur09 R	R:TCGGTCTCTTAACCAGCGTC	
Mfur10 F	F:(FAM)CTTCCCTCCACCCTCCAG	(CA)25
Mfur10 R	R:GAGGACTTCTAAAGCGGACTGA	
Mfur14 F	F:(HEX)TCGTGATGTAGGGTGAAATCAG	(CA)22
Mfur14 R	R:TGTGCGAGTGTGAGTTTGCT	
Mfur15 F	F:(NED)AAATGGAGCGATTAGGATGTG	(CA)19
Mfur15 R	R:TTCCCTCAAGAGTGTCTGGC	
Mfur25 F	F:(NED)CATGGCTGTCAAAGAAAAGGA	(TG)22
Mfur25 R	R:TGCCTGTAAGCATCAGCAAC	
Espécies Recifais		
<i>Cephalopholis fulva</i>		
Cfu 9 - F	F: (NED) CAAGTCTGATGCCAAAATTGA	(CA)7
Cfu 9 - R	R: CCGTGGTGGGTTTCTTACC	
Cfu 10 - F	F: (VIC) CGCCTCCCGTACATACAGAT	(CA)5
Cfu 10 - R	R: CCTCACCCGGTTTGAATATG	
Cfu 14 - F	F: (VIC) CGGGGAAGTGTTTTATTCCA	(CA)7
Cfu 14 - R	R: TGTGTGCATTTGTGCTGTGT	
Cfu 20 - F	F: (VIC) TGGCAGTTGATAATGCCAGA	(CA)8
Cfu 20 - R	R: GCGCCACATAACCTCTGTTT	
Cfu 25 - F	F: (NED) GCGCCACATAACCTCTGTTT	(AC)10
Cfu 25 - R	R: TGCATGAGCATCAGTGTCTG	
Cfu 43 - F	F: (FAM) GATGCGAATGTGAAGTGTGC	(GT)7
Cfu 43 - R	R: GGGCTCATAAAAACGAGCTGA	

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Cfu 57 - F	F: (FAM) AGGTTTTCCAGACCCTTTCC	(CA)14
Cfu 57 - R	R: AACGCTCAAACCTGAATGCAA	
Cfu 70 - F	F: (FAM) AGACCACACCAACCGTGTTT	(AGG)12
Cfu 70 - R	R: CGAGGCAGAAACCACAGAGT	
Cfu 80 - F	F: (NED) AGTGGGGCAAGTTTTGTTTG	(CA)14
Cfu 80 - R	R: CAAGCGGGTAAGTTGCTGT	Cfu 80 - R
<i>Epinephelus morio</i>		
Emor1 F	F:(FAM)GTGGGCATAAACAGGGATTAATG	(CA)13
Emor1 R	R:AGAATTCCTTTCGTTTTGGGTGT	
Emor6 F	F:(HEX)CTTGATTTGGCGCACACAC	(CA)20
Emor6 R	R:TGCACATAGTTTGTAGTGCATTTG	
Emor14 F	F:(FAM)CTCCCAAAGGATTATACAGAGGA	(AC)6/(CA)22
Emor14 R	R:AAATGAGTAAGAGGCTTTGATGCT	
Emor15 F	F:(FAM)GTGCATGCATGTATCTGTGTAAGA	(AC)9
Emor15 R	R:ACAGGGTCAGTGGAGTGAGATT	
Emor17 F	F:(HEX)ACTGGAGACTGGATTTTCACAAA	(CA)22
Emor17 R	R:GATCAAGCACAGTTCAGGTTAGG	
Emor19 F	F: (FAM)CTAAGGGTTTTATTCCCAAATGA	(TG)24
Emor19 R	R:CTGTTTCACACTTGCACTCTCTCT	
Emor24 F	F:(NED)TTTAAGGGACTTTCTCTCTCAGC	(CA)8
Emor24 R	R:ACACTTTTATTGATCCCACGATTT	
Emor26 F	F:(HEX)CCATAATAAAACCTCCGTTTCATGT	(GT)19
Emor26 R	R:TCCTTTGTTCCCTTTCAACTTAAC	
Emor33 F	F:(FAM)ATTGTCGTTGGGTAGTGTTACAGA	(GT)11
Emor33 R	R:GGACATGATCAGTGATATTTGGTG	

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Emor35 F	F:(NED)CACGAACACACGTATGCTGA	(CA)13
Emor35 R	R:TCCGTTTCTCTCTCCCTCT	
<i>Mycteroperca bonaci</i>		
Mbo029 - F	F: (VIC) GAGCACGCACACTGAGCAAC	(GT)14
Mbo029 - R	R: TGCCAGTAAGGCAAAGTGGTC	
Mbo048 - F	F: (NED) CAACGTTGTCATAATCTGAGCAT	(GACA)11
Mbo048 - R	R: CGTGGATGATGTAACTTTGGTG	
Mbo061 - F	F: (FAM) TGAAGAAATGTCAGATATTTTGTGGTG	(AC)11
Mbo061 - R	R: TCCCAAGAGTGTGAAGTTATAGG	
Mbo066 - F	F: (VIC) CGCATGTTTGTGAAGAACAGGAAG	(GT)8
Mbo066 - R	R: GCTTCACTCTTGGGTTGTTGG	
Mbo088 - F	F: (FAM) TGAACACCTTCACAATACTTTTCG	(GT)12
Mbo088 - R	R: TTGAGTATACCAGCAGTTGAACATC	
<i>Mycteroperca venenosa</i>		
Mve 30F	F:(HEX)GGCTTACAAGCAGCACACG	(AC)10
Mve 30R	R:GCTTTGCAGGGTGATGTAGG	
Mve 33F	F:(FAM)CCACACCTTCTTCGAGATGC	(CA)14
Mve 33R	R:TGTCCAGAGCGTCCTCTCC	
Mve 38F	F: (FAM)CAGGTCCCACAGTCATTATCC	(CA)12
Mve 38R	R:AGAAGCCTCGACAGTCTTGC	
Mve 40F	F: (NED) TGTGGCTCTGACACACACG	(CA)25
Mve 40R	R:CAAAATGTTCTGTGGTTTGG	
Mve21 - F	F: (FAM) CACTTAGCGGTTGATTGACG	(CA)26
Mve21 - R	R: GGGATTAGAACCCACACAGC	
Mve26 - F	F: (HEX) CTTCTGCTTTACACACACACA	(CA)18

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Mve26 - R	R: ATGACGATGGACACACGAAA	
Mve64 - F	F: (NED) CCAAAGCACCACTTTGTCC	(GT)26
Mve64 - R	R: GGCAGTGA CTCCCTTAGGC	
Mve68 - F	F: (FAM) AGAAAGCAGTGCAAACATGC	(AC)26
Mve68 - R	R: TCTCCCAGTCCTTCATTTGG	
Mve74 - F	F: (HEX) CACAGGGACATGTTGGACAG	(GAT)18
Mve74 - R	R: AGCCAATCAAAACAGCCAAG	
Mve57 - F	F: (NED) TCTGACCTTGACGACAGACG	(AC)15
Mve57 - R	R: TGGAAGGTTTTGACGTTTCC	
<i>Lutjanus analis</i>		
La25 - F	F: (FAM) GGA GGA ACC TCC TGG AAT GT	(ATCT)19
La25 - R	R: GTT TGC ACT TGA AGA AAA AGG GTG A	
La39 - F	F: (VIC) TGC TGA GGA GCA TTT GCT TT	(TG)11
La39 - R	R: GTT TAA AGT CAC ATA AAC GGG GAC T	
La27a - F	F: (FAM) CTT AGC AAG CCA ACA AAC AAT G	(AGAT)22
La27a - R	R: GTT TCC AAG GTC CAT TGA TCT TTA GTG	
La45a - F	F: (NED) AAC CAC ATC TGG CTC AAT CA	(TCCA)15
La45a - R	R: GTT TAG CCC CAG AGT AGG GTG AGA	
LaC-16 - F	F: (NED) GGT GTT GAT TGG TCC TCT GG	(TC)11(AC)8
LaC-16 - R	R: GTT TGG GGT TGG TAT TCA TCC AGT	
Lan6 - F	F: (VIC) CCCAAATGATTCTCTGAGTGTC	(CA)12
Lan6 - R	R: GGTACTTGTGTGTGAGCGTGTAGTT	
Lan9 - F	F: (FAM) GCTTCACACTCGCTGACACAT	(CA)11
Lan9 - R	R: GAGCCATTCTTCAACTCAACATC	
Lan11 - F	F: (NED) CCACAGAGTCCAAAGCAGAAAAG	(CA)22

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Lan11 - R	R: GCATCCACACACAGTAATCAGG	
Lan12 - F	F: (VIC) CCTCCAACATCTGACTCAAAGC	(CA)10
Lan12 - R	R: GGTGAGAGTGTGGTCCGAATG	
Lan13 - F	F: (FAM) GCAGTCCTCTTGAGTCCA	(CA)10
Lan13 - R	R: CTGCTTGACTGAGCGATAA	
<i>Lutjanus synagris</i>		
Lsy 1F	F: (HEX)CGACCAACACATTCAAACCT	(CA)18
Lsy 1R	R: GACATCAACACTATGACAGGC	
Lsy 4F	F: (FAM) CCTGTGGTTTGCTGATAG	(CA)32
Lsy 4R	R:GCATTAGTTGTTGCTGTCAC	
Lsy 5F	F: (FAM) CCAAGTTGATGCTTTGATTCTC	(CTT)24
Lsy 5R	R: CCTGAAAAAGGAGAGACACGG	
Lsy 6F	F: (FAM) GGAAAGAGAAGGACGGAGGA	(CA)18
Lsy 6R	R: GCTGCTACCACTGACGAGAAT	
Lsy 7F	F: (HEX) GCTGTAATCAAATCCCTGTG	(CA)12
Lsy 7R	R:GGTTCTCCAACCTGTTCTCCT	
Lsy 8F	F: (HEX) GCTGCTGCTTCACTGGA	(CA)17
Lsy 8R	R:GGAAACGAGTTGTTGTGACG	
Lsy 10F	F: (FAM)GTCAGCGTTGCTCTATCAGTG	(CA)23
Lsy 10R	R:GGAGAGATGGTTCCCTCAGT	
Lsy 11F	F:(NED)GACATTGTAACACTTGGTCAC	(CA)28
Lsy 11R	R:CCCTATTGAATGTAAGTGAGAC	
Lsy 13F	F: (NED)GCTGCACAGTGTGTTACCAG	(CA)15
Lsy 13R	R:GCTGAAGGAAGATTTGGAC	
Lsy 14F	F: (NED) CCTCTCCACCACATTATTCTC	(CA)12

Nome primer	Sequencia (5'-3')	Repetição
Lsy 14R	R:CCAGTATGTTTGAAAGGCG	
<i>Ocyurus chrysurus</i>		
Och 2 - F	F: (FAM) GGACAGTATCACTATTCTCGC	(CA)18
Och 2 - R	R: CCACAAGGTGTTGCTACTAA	
Och 4 - F	F: (NED) CGTCACTATGTGTCGCTAATCCGTT	(CA)14
Och 4 - R	R: GGCTCATTTCCTTCAGTCGTTTGG	
Och 6 - F	F: (FAM) CCTCTGGCATAACATCTCACATC	(CA)20
Och 6 - R	R: GCACACAAACACACCTCACCT	
Och 9 - F	F: (FAM) GCTCGTTCCTCTTAACATCAAC	(CA)14
Och 9 - R	R: GCTGTCAAGGTGTATG	
Och 10 - F	F: (FAM) CTCAGACAGTGGTTAACAGGATG	(GGA)11
Och 10 - R	R: CAGCATAGAGAACAATGTCAGTCA	
Och 11 - F	F: (NED) CCAGATACACTGATGCTAACCA	(CA)28
Och 11 - R	R: GGAGATGCCACGCTGC	
Och 13 - F	F: (VIC) CCTCATGCTTCAAACACACG	(CA)13
Och 13 - R	R: CTCTTCATCCCAAAACACAG	
Och 14 - F	F: (VIC) GGAGGTGTTGACAGCACA	(GA)10
Och 14 - R	R: CCTTGAAACCGTCCTGAT	

- DNA mitocondrial (barcoding)

Serão retiradas amostras de 05 exemplares de cada espécie, considerando todos os locais, tanto de peixes recifais quanto estuarinos. As amostras serão enviadas ao Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA - Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo) em São Mateus/ES (Quadro 53 e Quadro 54).

Quadro 53. Destinação das amostras coletadas durante o “Estudo e monitoramento ambiental das áreas dulcícola-ES, estuarina e marinha (anexo 7 – ictiofauna) sub-projeto: Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha”, coordenado pelo Prof. Maurício Hostim Silva (UFES campus São Mateus - CEUNES)

Amostra	Area geográfica	Instituição de coleta	Instituição de destino - amostra	Instituição de destino - dados	Professor(a) responsável
Peixes estuarinos	Pirajube-Açu (áreas interna e externa)	UFES - campus Goiabeiras	UFES - campus Goiabeiras	UFES - campus Goiabeiras	Jean-Christophe Joyeux
Peixes estuarinos e crustáceos	Doce (área interna)	UFES - campus Goiabeiras	UFES - campus Goiabeiras	UFES - campus Goiabeiras e São Mateus (CEUNES)	Jean-Christophe Joyeux (pontos 1U e 2UC) e Maurício Hostim Silva (ponto 2UC)
Peixes estuarinos e crustáceos	Doce (área externa - microescala)	UFES - campus Goiabeiras	UFES - campus Goiabeiras	UFES - campus Goiabeiras	Jean-Christophe Joyeux
peixes estuarinos e crustáceos	Doce (área externa - macroescala)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	Maurício Hostim Silva
Peixes estuarinos e crustáceos	Ipiranga e São Mateus (áreas interna e externa)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	Maurício Hostim Silva
peixes estuarinos e crustáceos	Caravelas (áreas interna e externa)	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	Fabiana César Felix-Hackradt
genética - populações (peixes estuarinos e recifais)	Doce, Ipiranga, São Mateus e Caravelas	UFES - campus São Mateus (CEUNES) e UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	Fabiana César Felix-Hackradt
genética - barcoding (peixes estuarinos)	Doce, Ipiranga, São Mateus e Caravelas	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	UFES - campus São Mateus (CEUNES)	Ana Paula Cazerta Farro
recrutamento	fóz dos rios Doce, Mucuri e São Mateus	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	Fabiana César Felix-Hackradt
otólitos	Doce, Ipiranga, São Mateus e Caravelas	UFES campus São Mateus (CEUNES)	UNESP - campus Registro	UNESP - campus Registro	Felippe Daros
telemetria estuarinos	Doce e área marinha adjacente	UFES campus São Mateus (CEUNES)	UFES campus São Mateus (CEUNES)	UFES campus São Mateus (CEUNES)	Maurício Hostim Silva
telemetria peixes recifais	ParNa, Abrolhos e recifes em frente ao rio São Mateus/ES	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	Carlos Werner Hackradt
peixes recifais	APA costa das Algas, recifes em frente ao rio São Mateus (norte do Espírito Santo), área em frente ao rio Caravelas, Parcel das Paredes, ParNa Abrolhos	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	UFSB - Porto Seguro	Carlos Werner Hackradt

Quadro 54. Contatos dos professores responsáveis pelo “Estudo e monitoramento ambiental das áreas dulcícola-ES, estuarina e marinha (anexo 7 – ictiofauna) sub-projeto: Estudo e monitoramento da ictiofauna marinha”, coordenado pelo Prof. Maurício Hostim Silva (UFES campus São Mateus - CEUNES)

Professor (a) responsável	Instituição/endereço	Telefone	Celular
Ana Paula Cazerta Farro	UFES/CEUNES/DCAB - LGCA Rodovia Governador Mário Covas (BR-101) km 60 Norte – CEP 29932-540 - São Mateus/ES	(27)3312-1545	(27)98151-2289
Carlos Werner Hackradt	UFSB – campus Sosigenes Costa - LECOmar Rodovia BR-367 km 10 – Zona rural – CEP 45810-000 – Porto Seguro/BA	(73)3288-8426	(73)99108-2630
Fabiana César Felix-Hackradt	UFSB – campus Sosigenes Costa - LECOmar Rodovia BR-367 km 10 – Zona rural – CEP 45810-000 – Porto Seguro/BA	(73)3288-8400	(73)99108-1001
Felippe Daros	UNESP, Campus Experimental de Registro - Coordenadoria de Curso de Engenharia de Pesca - Av. Nelson Brihi Badur, 430 – sala 14 – Vila Tupi – CEP 11900-000 – Registro/SP	(13) 3828-2900 Ramal 2956	(47)9121-6706

Professor (a) responsável	Instituição/ endereço	Telefone	Celular
Jean-Christophe Joyeux	UFES <i>campus</i> Goiabeiras - Lablctio Av. Fernando Ferrari, 514 – bairro Goiabeiras - CEP 29075-910 – Vitória /ES	(27)4009-7791	-
Maurício Hostim Silva	UFES/CEUNES/DCAB - LEPM Rodovia Governador Mário Covas (BR-101) km 60 Norte – bairro Litorâneo - CEP 29932-540 - São Mateus/ES	(27)3312-1538	(27)99846-6299

d) Recrutamento – peixes estuarinos e recifais

Após a coleta, os peixes serão anestesiados em solução de benzocaína até eutanásia e após, acondicionados em potes plásticos de 500 mL, devidamente etiquetados conforme Quadro 55, contendo álcool 70% para a sua preservação (Félix-Hackradt, 2013). Os potes serão armazenados em caixas organizadoras e transportados para o laboratório responsável, onde serão mantidos até o momento do processamento.

Quadro 55. Exemplo de etiqueta para identificação de amostras

RRDM Laboratório Data: / /201 Local: Ponto/noite: Código de ID:
--

Em laboratório, as amostras foram triadas e as pós-larvas foram separadas de outros organismos como crustáceos, poliquetas, medusas e outros componentes do zooplâncton. As pós-larvas de peixes foram primeiramente morfotipadas e separadas por família. Em seguida, com auxílio de microscópio estereoscópico e literatura especializada (MENEZES et. al., 2003; RICHARDS, 2005; BONECKER et. al., 2014), foram identificados individualmente ao menor nível taxonômico possível, considerando os caracteres merísticos, padrão de coloração, fotóforos, dentre outros. Para cada indivíduo foi mensurado o comprimento total, com auxílio de paquímetro digital, e o peso úmido em balança de precisão. Para as espécies que, em uma mesma amostra, apresentaram uma abundância superior a 30 indivíduos, foram considerados o peso e o comprimento de 30 indivíduos aleatórios da amostra, e para os demais foi registrada a abundância e a biomassa total.

Todas as espécies serão fotografadas para composição de um banco de imagens das fases larvais e juvenis das espécies de peixes capturadas. Após a identificação, os indivíduos serão acondicionados e tombados em coleção zoológica quando cabível.

e) Telemetria – peixes estuarinos/marinhos e recifais

Após a marcação e recaptura dos peixes marcados, durante as saídas para coleta de dados as informações provenientes dos receptores acústicos foram descarregadas em computadores utilizando o VR100 Host Software v.3.5.0 (Vemco®).. Após a aquisição dos arquivos de dados estes serão encaminhados via e-mail para o banco de dados do Anexo 7.

4.8. ANEXO 8 - MONITORAMENTO DA SEDIMENTAÇÃO NO PARQUE NACIONAL MARINHO DE ABROLHOS

A motivação deste trabalho está na melhoria das interpretações da dispersão das plumas de sedimentos em áreas costeiras por sensoriamento remoto, principalmente para áreas atingidas que estão relativamente distantes das fontes, e que muitas vezes não elucidam suficientemente a questão da dispersão em si. Alguns outros fatores são considerados importantes, tais como: a falta de estudos voltados para a calibração das imagens de satélite; o deslocamento das plumas que pode ocorrer em sub-superfície e não serem detectadas pelo sensoriamento remoto; e, devido ao fato da turbidez ser um parâmetro de alta complexidade regional, o estuário de Caravelas se torna um contribuinte de sedimentos para a região de Abrolhos, sendo um marcador regional. Com isso, a partir das amostras coletadas neste campo, serão empregadas como estratégia de trabalho o uso de ferramentas complementares ao sensoriamento remoto, tais como: (1) a técnica de assinatura isotópica baseadas nas razões dos isótopos radiogênicos de $87\text{Sr}/86\text{Sr}$ e $143\text{Nd}/144\text{Nd}$; (2) a análise da quantidade de Fe e Mn na presente na água; (3) na análise elementar (Si, Al, Fe, Ti, Ca, Cl, Zn, Cu, K, Mg e Na) de partículas por EDS; e (4) na análise gravimétrica do material particulado suspenso (MPS) total na superfície do oceano. O processo analítico está sendo realizado pela Uerj, através de seu Instituto de Biologia e Departamento de Geologia.

4.8.1. Filtragem da água superficial coletada

Depois da coleta da água superficial, as amostras de água são levadas para a filtragem. Antes da amostragem, os filtros de fibra de vidro 47mm (GF/F) Whatman®, com porosidade $0,4\mu\text{m}$, são armazenados em placas de petri e colocados em estufa à 40° para secagem, por no mínimo 24 horas. Na sequência, são pesados e colocados em tubo falcon devidamente identificados e lacrados para que não haja contaminação externa.

O kit de filtração (manifold) é equipado com 3 filtros (previamente pesados e identificados) e em sequência, ligado à uma bomba de vácuo. A água coletada em cada ponto amostral é filtrada, e após esse procedimento os filtros são rinsados com 250mL de água miliQ, afim de desalinizar os mesmos. Após serem desalinizados, os filtros são armazenados em tubos falcon para a posterior análise laboratorial. A Figura 27 indica o processo de filtragem.

Figura 27: Sistema de filtragem com *Manifold*.



Após retornar da campanha, os filtros foram colocados em estufa para secagem, e pesados individualmente para se obter o peso total final do filtro. Esse valor, subtraído do valor do filtro seco obtido anteriormente na preparação de coleta, indicará o peso da amostra. O peso dividido pelo volume filtrado resultará na concentração do MPS (mg/L). Esse valor será usado para a calibração dos valores obtidos através das imagens de satélite através da comparação dos valores.

4.8.2. Definição de assinatura geoquímica (por isótopos radiogênicos Sr/Nd)

Para se identificar a proveniência continental de sedimentos a combinação das assinaturas dos isótopos radiogênicos $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ é uma das mais qualificadas, devido, entre outros fatores, suas razões típicas em determinados domínios geológicos (LEE *et al.*, 2010). Essas razões estão pouco sujeitas ao fracionamento isotópico decorrente do intemperismo quando aplicado aos estudos de curta escala de tempo (GAIERO *et al.*, 2004). Além disso, a composição dos isótopos radiogênicos de Sr e Nd da litosfera são significativamente diferentes do manto, o que permite a distinção entre as suas origens litológicas das zonas vulcânicas jovens e dos velhos escudos continentais (GROUSET & BISCAYE, 2005). Deste modo, a análise desses isótopos permite definir uma assinatura geoquímica de origem para a pluma de sedimentos da lama de rejeitos da Samarco em relação a outras áreas da zona costeira em torno da foz do Rio Doce.

a) Protocolo de análises de Sr/Nd

As análises serão realizadas no laboratório LAGIR/UERJ (LAGIR – Laboratório de Geocronologia e Isótopos Radiogênicos) de acordo com o protocolo que segue:

(A) Preparação de amostras em membranas de policarbonato (filtros);

(B) Procedimentos de digestão e separação química para análises isotópicas:

(B1) Separação em coluna primária de estrôncio (Sr) e dos elementos terras-raras (ETRs);

(B2) separação em coluna secundária do neodímio (Nd) e do samário (Sm)

(C) Deposição de amostras em filamento;

(E) Análise espectrométrica.

b) Preparação de amostras em Membranas de policarbonato

Para a preparação da amostra em filtros de policarbonato, se dá pela retirada do sal marinho, a saber:

1. Adicionar 1mL de água milli-Q em tubo de centrifuga;

2. Centrifugar por 15 min a 2500 RPM;

3. Transferir sobrenadante para o tubo falcon;

4. Secar em estufa por 24h a 60°C o material precipitado (filtros com carbonatos e silicatos), não trocar de recipiente;

5. Pesar;

Para a retirada de carbonatos marinhos, e a partir da amostra da etapa anterior, deve-se acrescentar 1ml de HCl 1M (ácido ultrapuro) no tubo de centrifuga, centrifugar por 15 min a 2500 RPM e separar o sobrenadante e guardar. Em seguida deixar em estufa por 24h a 60°C. Por fim, realizar procedimento de digestão do material (solução +filtro) de acordo com o protocolo do LAGIR- Item C-2

c) Procedimentos de digestão e separação química para análises isotópicas no LAGIR – Laboratório de Geocronologia e Isótopos Radiogênicos

O procedimento a seguir deve ser seguido para a digestão e separação química na análise isotópica:

1. Pesar aproximadamente 50 mg de material pulverizado e traçador isotópico Sm-Nd (7 mL) ou bombas.

2. Adicionar 3mL de HF (ácido fluorídrico) concentrado, bidestilado e 0,5mL de HNO₃ (ácido nítrico) 7N bidestilado.

3. Aquecer por 30 minutos em chapa quente (80-90°C), para eliminação de H_2O e o SiF_4 (Fluoreto de Silício);
4. Deixar resfriar, fechar e colocar o recipiente **Savillex®**; em chapa quente (120-130°) ou bomba em estufa (180-190°C) por três dias.
5. Em seguida deixar esfriar (60°), abrir o frasco e evaporar em chapa quente (80-90°C) até a secura;
6. Adicionar 1mL de HNO_3 7N bidestilado e evaporar até a secura em chapa quente (80-90°C), para eliminar o excesso de HF.
7. Adicionar 6 mL de HCl (ácido clorídrico) 6N bidestilado. Aquecer por 2 dias em estufa (180-190°C). Retirar da estufa, deixar resfriar e evaporar em chapa quente (80-90°C) até a secura.

Algumas observações devem ser ressaltadas:

- Caso a dissolução da amostra não estiver completa evaporar e repetir o procedimento de digestão;
- Caso amostra contenha matéria orgânica adicionar lentamente 10 mL de H_2O_2 30% (peróxido de hidrogênio), aguardando o término da reação.
- Evaporar as amostras, aguardando esfriar.
- Adicionar em seguida 1mL de H_2O_2 30% verificando nenhum indício de reação;
- Evaporar as amostras em chapa quente com temperatura branda e, em seguida, realizar novamente a digestão química.
- Caso a dissolução esteja completa, seguir com a evaporação em chapa quente (80-90°C) até a secura;
- Adicionar 1,0 mL de HCL 2,5N e reservar para a separação cromatográfica.

d) Procedimentos de Separação Química

- Separação cromatográfica em coluna primária dos elementos terras-raras (ETRs) e estrôncio (Sr)

1. Condicionar a coluna com 10 mL de HCl 2,5 N.
2. Adicionar a amostra diluída em 1mL de HCl 2,5N.
3. Lavar o bulbo da coluna com 1 mL de HCl 2,5N por três vezes, este procedimento tem a finalidade de garantir que toda amostra passe para dentro da coluna.
4. Adicionar 7mL de HCl 2,5N, repetir este procedimento por mais duas vezes e descartar. Esta etapa tem por objetivo eliminar os elementos da matriz da amostra que não sejam Sr e os (ETRs).
5. Adicionar 8 mL de HCl 2,5N e coletar a fração contendo o Sr.

6. Adicionar 3 mL de HCl 2,5N e descartar.
7. Adicionar 15 mL de HCl 6N, coletar esta fração contendo os (ETRs) e evaporar em chapa quente (90-100°C) até a secura.
8. Regenerar a coluna com 30 mL (bulbo cheio) de HCl 6N
9. Estocar em solução de HCl 2,5N.
10. Evaporar as frações de Sr e ETRs em chapa a 90-100°C até a secura:
- 10.1. Sr: Reservar para depósito em filamento para análise espectrométrica (etapa E abaixo);

- Separação cromatográfica em coluna secundária do neodímio (Nd) e do samário (Sm)

1. ETRs: Diluir o obtido com 0,2mL de HCl 0,18N.
2. Condicionar com 3mL de HCl 0,18N.
3. Adicionar a amostra diluída em 0,2mL de HCl 0,18N;
4. Lavar o bulbo com 0,2 mL de HCl 0,18N, por três vezes.
5. Adicionar 9mL de HCl 0,18N e descartar.
6. Coletar o Nd com 2,0mL de HCl 0,18N ;
7. Lavar a coluna com 2,0mL de HCl 0,18N e descartar;
8. Lavar com 1mL de HCl 0,5N e descartar;
9. Coletar o Sm com 2,0mL de HCl 0,5N ;
10. Regenerar a resina com 6,0 mL (Bulbo cheio) de HCl 6N (bulbo cheio)
11. Estocar em solução de HCl 0,18N.

e) Deposição de amostras em filamento

A deposição de amostra é feita em filamento de Re (Rênio) com arranjo duplo (metodologias Sm-Nd e Sr-Sr) previamente degasificados. Este procedimento é feito em ambiente clean room dentro de capela de fluxo laminar.

1. Colocar o filamento em um amperímetro com auxílio de um alicate;
2. Selar as extremidades com parafilm® (para evitar perda de amostras pelas laterais);
3. Utilizar uma pipeta (1-10µL) com uma ponteira previamente limpa;
4. Adicionar 3µl de H₃PO₄ 1N no recipiente;
5. Varrer o fundo do recipiente com a ponteira;
6. Depositar a amostra no centro do filamento;
7. Submeter a uma corrente inicial de 1,5A (para evaporação do parafilm®, água e ácido);
8. Elevar a corrente cautelosamente até aproximadamente 2,2A (levemente ao rubro) por 3s;

9. Diminuir ligeiramente até a corrente zero.
10. Acondicionar os filamentos na caixa ordenadamente.

f) Análise espectrométrica

As análises espectrométricas são realizadas em um espectrômetro de massa portermo-ionização (TIMS) no LAGIR-UERJ (Valeriano et al., 2003).

1. Inserir os filamentos com amostras em um carrossel na fonte de ionização no espectrômetro e analisados no espectrômetro de massa para obtenção das razões isotópicas. As análises de Nd, Sm e Sr são realizadas em modo estático com até 8 coletores Faraday com erro padrão absoluto expresso em 2σ ;
2. Análise de Sr:
 - a. Submeter o filamento de ionização a corrente elétrica fixa em 3200 mA;
 - b. Submeter o filamento de evaporação entre as correntes 1800-2200 mA, variando de acordo com a amostra, obtendo-se 100 ciclos por análise;
 - c. A razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ obtida é corrigida por fracionamento isotópico utilizando a razão $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 8,3752$ e para uma possível interferência isobárica causada pelo ^{87}Rb , corrige-se utilizando a razão $^{87}\text{Rb}/^{85}\text{Rb} = 0,3860$.
3. Análises de Nd e Sm:
 - a. Submeter o filamento de ionização a corrente elétrica fixa em 4500 mA
 - b. Submeter o filamento de evaporação entre as correntes 1800-2200 mA, variando de acordo com a amostra, obtendo-se 160 ciclos por análise de Nd e 80 ciclos por análise de Sm.
 - c. As razões isotópicas obtidas pelo método Nd são: $^{142}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{145}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{146}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$, $^{148}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ e $^{150}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ são normalizadas (exceto $^{146}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$) para correção do fracionamento isotópico utilizando a razão $^{146}\text{Nd}/^{144}\text{Nd} = 0,7219$.
 - d. As razões isotópicas obtidas pelo método Sm são: $^{147}\text{Sm}/^{152}\text{Sm}$ (não normalizada) e $^{149}\text{Sm}/^{152}\text{Sm}$ normalizada para correção do fracionamento isotópico utilizando a razão $^{147}\text{Sm}/^{152}\text{Sm} = 0,5608$.
4. O valor do branco das amostras para Nd são abaixo de 200 pg e 70pg para Sm.
5. Para certificação, as análises de padrões internacionais JNdi-1 (Tanaka et al., 2000), NBS-987 (NIST) e padrões de rocha USGS (Valeriano et al., 2008; Neto et al., 2009; Valeriano et al., 2009) são realizadas periodicamente no LAGIR.
6. A média das análises de JNdi-1 ($n = 381$) da razão $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ é igual a $0,512098 \pm 0,000006$, e a média das análises de NBS-987 ($n = 158$) da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ é igual a $0,710239 \pm 0,000008$.

g) Filtragem de amostras de água

Os filtros utilizados nesta etapa foram os filtros de polycarbonato, 47 mm de diâmetro e com 0,4µm de porosidade. O procedimento de filtragem é o mesmo efetuado para análise de MPS.

4.8.3. Análise da abundância relativa elementar em micro-partículas através de MEV+EDS

Para a investigação de pequenas quantidades de possível material de rejeito serão empregadas as análises de microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (EDS), que é uma técnica que investiga as micropartículas de forma individual e, desta forma, é possível investigar se qualquer resíduo de lama está presente em Abrolhos.

A composição elementar das partículas é obtida a partir da análise do espectro gerado pela detecção dos raios-X produzidos pela interação do feixe de elétrons incidentes sobre a superfície das partículas. Cada elemento produz raios-X em faixas de energia específicas, de tal maneira que a análise elementar se torna possível para a identificação de elementos com número atômico superior a 10 ($Z > 10$). Esta técnica permite que a análise elementar seja feita de forma pontual ou por uma área determinada, de acordo com a abertura utilizada para incidência do feixe de elétrons sobre a amostra. Neste método, alvos são confeccionados com diâmetros de aproximadamente 1 cm contendo material particulado. Tais alvos são previamente investigados ao MEV para se selecionar partículas com morfologias predominantes, sobre as quais serão realizadas as análises elementares. Para tal, nesta abordagem preliminar, será determinada as abundâncias relativas de C, O, Si, Al, Fe, Ti, Ca, Cl, Zn, Cu, K, Mg e Na. Considerando que o substrato para as análises de EDS é um polycarbonato, os valores de abundância relativa destes elementos serão corrigidos para a exclusão de C nas amostras.

Para a análise morfológica e elementar das partículas suspensas, 1/4 do filtro será submetida a análise de MEV + EDS em espectrofotômetro instalado e operacional na UERJ, os outros 3/4 restantes deverão ser armazenados em ambiente refrigerado para outras análises.

- Filtragem de amostras de água

Os filtros utilizados nesta etapa foram os filtros de polycarbonato, 47 mm de diâmetro e com 0,4µm de porosidade. O procedimento de filtragem é o mesmo efetuado para análise de MPS.

4.8.4. Razão elementar Fe: Mn como marcador da concentração/dispersão da lama de minério da samarco em abrolhos

A razão elementar de Fe:Mn foi escolhida por se tratar dos elementos majoritários presentes no minério da Samarco (com exceção do Si) e por terem padrões de solubilidade diferenciados. Estes dados possibilitaram uma comparação direta com as medidas deste mesmo parâmetro realizadas pela CPRM no Rio Doce antes e após o acidente de Mariana. O resultado da comparação evidenciará se as razões Fe:Mn para a lama de minério da Samarco é significativamente menor ou

maior do que as razões dos sedimentos em Abrolhos. Desta forma, esta razão mostra-se potencialmente boa para dar continuidade ao monitoramento em Abrolhos.

Para as amostras de Abrolhos, foi pré-definido um volume de amostra de 5L de água do mar, no sentido de se garantir a detectabilidade necessária à técnica de composição elementar (e também dos isótopos radiogênicos, principalmente os isótopos de Nd).

Galões plásticos de polipropileno (PP) são previamente lavados com água miliQ em laboratório e rinsados no local de amostragem com água do mar. Nos locais estabelecidos para a amostragem, as coletas são realizadas a cerca de 0,4 m de profundidade. Após serem colocados dentro da embarcação, os galões são lacrados e identificados. O processo de filtragem ocorreu da mesma maneira que as demais filtragens citadas acima.

Para a análise, alíquotas de 100 mL deverão ser transferidas para tubos cônicos de 100 mL, adicionando-se HNO₃ subdestilado para determinação de metais dissolvidos. Para a conservação das amostras, durante o transporte a temperatura das amostras deverá ser mantida em 4°C e para o armazenamento de até -20°C. A determinação dos metais deverá ser realizada por ICP-OES (Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado).

5. REFERÊNCIAS

ABNT NBR 12713. 2016. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Associação Brasileira de Normas Técnicas, quarta edição, 19 de maio.

ABNT NBR 13373. 2017. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Associação Brasileira de Normas Técnicas, quinta edição, 29 de março.

ABNT NBR 15088. 2016. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*). Associação Brasileira de Normas Técnicas, terceira edição, 13 de dezembro.

ABNT NBR 15470. 2013. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda e crônica- método de ensaio com *Hyalella* spp (*Amphipoda*) em sedimentos. Associação Brasileira de Normas Técnicas, segunda edição, 25 de novembro.

ABNT NBR 15499. 2016. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica decurta duração — Método de ensaio com peixes. Associação Brasileira de Normas Técnicas, terceira edição, 08 de abril.

ABNT NBR 16181:2013. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com microalgas marinhas. Associação Brasileira de Normas Técnicas, primeira edição, 18 de junho.

ABNT NBR ISO/IEC 17043. 2017. Avaliação da conformidade — Requisitos gerais para ensaios de proficiência. Associação Brasileira de Normas Técnicas, versão corrigida, 25 de agosto.

APG IV – 2016. THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, 181, 1–20.

APHA – American Public Health Association. 2005. AWWA – American Water Works Association. WEF – Water Environment Federation. Biological Examination (10000): 10200 Plankton. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF)

APHA – American Public Health Association. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. APHA, Washington, DC.

APHA (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Part 3, Determination of Metals. 17th, American Public Health Association, Washington DC, 164.

ARIF C., DANIELS C., BAYER T., BANGUERA-HINESTROZA E., BARBROOK A., HOWE C.J., VOOLSTRA C. R. (2014). Assessing Symbiodinium diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. Mol. Ecol. 23(17): 4418-4433.

Arnold, J. G., R. Srinivasan, R. S. Muttiah, and J. R. Williams. 1998. Large-area hydrologic modeling and assessment: Part I. Model development. *Journal of American Water Resources Association*, 34(1):73-89

ASTM (2015). D3974-09, Standard Practices for extraction of trace elements from sediments. ASTM International: West Conshohocken, PA.

ATAMANCHUK D., KONONETS M., THOMAS P.J., HOVDENES J., TENGBERG A., HALL P.O.J. (2015) Continuous long-term observations of the carbonate system dynamics in the water column of a temperate fjord. *Journal of Marine Systems*, 148, 272–284.

BAHIA, R. G. 2014. Algas coralináceas formadoras de rodolitos da plataforma continental tropical e ilhas oceânicas do Brasil: levantamento florístico e taxonomia. Tese de Doutorado, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 221 pp.

BAHIA, R.G.; ABRANTES, D.P.; BRASILEIRO P.S.; PEREIRA-FILHO G.H.; AMADO-FILHO, G.M. 2010. Rhodolith bed structure along a depth gradient on the northern coast of Bahia State, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58: 323-337.

BARATA, D. 2004. Clorofíceas marinhas bentônicas do Estado do Espírito Santo. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. 210p.

Battarbee, R. W.; Jones, V.; Flower, R. J.; Cameron, N.; Bennion, H.; Carvalho, L. & Juggins, S. 2001. Diatoms. In: Smol, J. P; Birks, H. J. B.; Last, W. M. (ed.). Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. London: Kluwer Academic Publishers.v.3. p. 155-203.

BEIJBOM, O.; EDMUNDS, P.J.; ROELFSEMA, C.; SMITH, J.; KLINE, D.I.; NEAL, B.P. et al. 2015. Towards automated annotation of benthic survey images: Variability of human experts and operational modes of automation. PLoS ONE 10(7): e0130312.

BIBBY, C.J., BURGESS, N.D. & HILL, D.A. (1992). Bird census techniques. British Trust for Ornithology and the Royal Society for the Protection of Birds. London, Academic Press, 257p.

Bicudo, C.EM. & Bicudo, D.C. (2007). Amostragem em Limnologia. Cap 9: Métodos de coleta, preservação, contagem e determinação de biomassa em zooplâncton de águas epicontinentais. 2ª ed. São Carlos, SP.

BLOTT, S. J.; PYE, K. 2001. GRADISTAT: A grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. Earth Surface Processes and Landforms.

BONECKER, A.C.T. & CASTRO, M.S. 2006. Atlas de larvas de peixes da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira. Museu Nacional Série Livros n. 19. Rio de Janeiro. 216 p.

BONECKER, A.C.T.; NAMIKI, C.A.P.; CASTRO, M.S.; & CAMPOS, P.N. 2014. Catálogo dos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes da bacia de Campos. [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Zoologia: guias e manuais de identificação series. Disponível em SciELO Books. 295 p.

BOSENCE, D. W. J. & PEDLEY, H. M. 1982. Sedimentology and palaeoecology of Miocene coralline algal biostrome from the Maltese Islands. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 38: 9–43.

BRAGA, AA, FRANSOZO, A, BERTINI, G, FUMIS, PB; 2005. Composição e abundância dos caranguejos (Decapoda, Brachyura) nas regiões de Ubatuba e Caraguatatuba, litoral norte paulista, Brasil. Biota Neotropica 5(2): 1 – 5.

BRASILEIRO, P.S.; PEREIRA-FILHO, G.H.; BAHIA, R.G.; ABRANTES, D.P.; GUIMARÃES, S.M.P.B.; MOURA, R.L.; FRANCINI-FILHO, R.B.; BASTOS, A.C.; AMADO-FILHO, G. M. 2015. Macroalgal composition and community structure of the largest rhodolith beds in the world. Marine Biodiversity, 46:407.

BRENDEL O, LOSETTA PPMG, STEWART D. 2000. A rapid and simple method to isolate pure alpha cellulose. Phytochemistry Annal, v. 17, p. 7-10.

Bridson, D. & Forman, L.1998. The Herbarium Handbook. Richmond: Royal Botanical Garden, Lubrecht & Cramer Ltd. 348p.

- BROOM, J.E.S.; HART, D. R.; FARR, T. J.; NELSON, W. A.; NEILL, K. F.; HARVEY, A. S.; WOELKERLING, W. J. 2008. Utility of psbA and nSSU for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Mol. Phyl. Evol.* 46: 958–973.
- BROWER, J.E., ZAR, J.H. 1984. *Field & laboratory methods for general ecology*. 2nd ed. Brown Publishers, Boston. 226p.
- BROWN-PETERSON, NJ, WYANSKI, DM, SABORIDO-REY, F, MACEWICZ, BJ & LOWERRE-BARBIERI, SK. 2011. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science* 3:52 – 70.
- BUCKLAND ST, ANDERSON DR, BURNHAM KP, LAAKE JL, BORCHERS DL, THOMAS L. 2001. *Introduction to Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- CAMBARDELLA, C.A., MOORMAN, T.B., NOVAK, J.M., PARKIN, T.B., KARLEN, D.L., TURCO, R.F., KONOPKA, A.E. 1994. Field-scale variability of soil properties in central Iowa soils. *Soil Science Society of America Journal*, 58:1501-1511.
- CARNIELLO, L; D'ALPAOS, A.; DEFINA, A. 2011. Modeling Wind waves and tidal flows in shallow micro-tidal basins. "Estuarine, Coastal and Shelf Science", 92, 263 – 276.
- Carvalho, N. O. (2008). *Hidrossedimentologia prática*. 2º ed. Rio de Janeiro, Interciência
- CERVIGÓN, F. 1996. *Los peces marinos de Venezuela*. Caracas. Fundación Científica Los Roques.
- CHENNU A.; FARBER P.; DE'ATH, G., de BEER, D.; FABRICIUS, K.E. 2017. A diver-operated hyperspectral imaging and topographic surveying system for automated mapping of benthic habitats. *Scientific Reports* 7: 7122.
- COSTA, RC, FRANSOZO, A, MELO, GAS, FREIRE, FAM, 2003. Chave ilustrada para identificação dos camarões Dendrobranchiata do litoral norte do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 3(1): 1 – 5.
- CRANE, J. 1975. *Fiddler crabs of the world: Ocypodidae: genus Uca*. Princeton, University Press, p.736.
- DAUBECHIES, I. 1990. The wavelet transform, time-frequency localization and signal analysis
- DE GRISSE, A.T.1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilisée dans l'étude des nematodes phytoparasitaires. *Mededelingen Rijksfaculteti der Landbouveten Gent*. p.351–369.
- DEAN, R. G. 1977. *Equilibrium beach profiles: US Atlantic and Gulf coasts*. Department of Civil Engineering and College of Marine Studies, University of Delaware
- DOS ANJOS, L., OLIVA, M. A., KUKI, K. N. 2012. Fluorescence imaging of light acclimation of brazilian atlantic forest tree species. *Photosynthetica*, v.50, n.1, p.95-108,

DOS SANTOS WD, FERRARESE ML, NAKAMURA CV, MOURÃO KSM, MANGOLIN CA, FERRARESE-FILHO O. 2008. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid: the possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 1230-124.

DUBELAAR G.B.J., JONKER R.R. (2000) Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* 64 (2): 135-156.

DUTRA, V. F., ALVES-ARAÚJO, A., CARRIJO, T. T. 2015. Angiosperm Checklist of Espírito Santo: using electronic tools to improve the knowledge of an Atlantic Forest biodiversity hotspot. *Rodriguésia* 66 (4): 1145-1152.

EARL, D. A., & B. M. VONHOLDT. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources Santa Cruz, CA* 4: 359–361.

EMERY, W. J. THOMSON, R.E. 2001. *Data analysis methods in physical oceanography*. Amsterdam: Elsevier.

EPA 3051A. 1998. Microwave assisted acid digestion of sediments sludges, soils and oils. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 3.2. 01 de janeiro.

EPA 3051A. 1998. Microwave Asst Acid Digestion Sediments/Soil/Oil. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 3.2, 01 de janeiro.

EPA 3052. 1996. Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 3.2, 01 de dezembro.

EPA 350.1. 1993. Ammonia (as N) Semi-Automated Colorimetry. United States Environmental Protection Agency, 600/R-93-100, 01 de agosto.

EPA 3510C. 1996. Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 4.2.1, 01 de dezembro.

EPA 353.2. 1993. Nitrate-Nitrate by Automated Colorimetry. United States Environmental Protection Agency, 600/R-93-100, 01 de setembro.

EPA 3540C. 1996. Soxhlet Extraction – Organics. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 4.2.1. 01 de dezembro.

EPA 3630C. 1996. Silica Gel Cleanup (florisil). United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 4.2.2 , 01 de dezembro.

EPA 3630e Silica Gel Cleanup;

EPA 365.5. 1997. Orthophosphate by automated colorimetric. United States Environmental Protection Agency, 600/R-97-072, 01 de outubro.

EPA 366.0. 1997. Dissolved Silicate by gas segmented. United States Environmental Protection Agency, CF/CA 600/R-97-072, 01 de setembro.

EPA 5021A. 2014. Volatile Organic Compounds In Various Sample Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis, Method 528 Determination Of Phenols In Drinking Water By Solid Phase Extraction And Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). United States Environmental Protection Agency, 01 de julho.

EPA 6020A. 1998. Inductively Coupled Plasma/MS. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 3.3, 01 de janeiro

EPA 8041A. 2007. Phenols By Gas Chromatography. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 4.3, 01 de fevereiro.

EPA 8270C. 1996. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 4.3.2, 01 de dezembro.

EPA 8270D. 1998. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). United States Environmental Protection Agency, SW-846 Ch 4.3.2, 01 de dezembro.

ESCHMEYER, W.N.; FRICKE, R.; VAN DER LAAN, R. (Eds). 2019. Catalog of Fishes. Disponível em <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso 05/01/2018.

EVANNO, G., S. REGNAUT, & J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* v. 14, p. 2611–2620.

EXCOFFIER, L., & H. E. L. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* v. 10, p. 564–567.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.

FAHAY, M.P. 2007. Early Stages of Fishes in the Western North Atlantic Ocean (Davis Strait, Southern Greenland and Flemish Cap to Cape Hatteras). Northwest Atlantic Fisheries Organization. Nova Scotia, Canadá: 1696 p.

FÉLIX-HACKRADT, F.C., HACKRADT, C.W., TREVIÑO-OTÓN, J., SEGOVIA-VIADERO, M., PÉREZ-RUZAF A. GARCÍA-CHARTON, J. A. 2013. Environmental determinants on fish post-larval distribution in coastal areas of south-western mediterranean sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 129, 59e72.

FENNEL, K. 2010. The role of continental of continental shelves in nitrogen and carbon cycling: Northwestern North Atlantic case study. *Ocean Sci.* v. 6, p. 539-548.

FENNEL, K.; ABBOTT, M. R.; SPITZ, Y. H.; RICHMAN, J. G.; NELSON, D. M. 2003. Impacts of iron control on phytoplankton production in the modern and glacial Southern Ocean. *Deep-Sea Res. II*. v. 50, p. 833-851.

FENNEL, K.; HETLAND, R.; FENG, Y.; DiMARCO, S. 2011. A coupled physical-biological model of the Northern Gulf of Mexico shelf: Model description, validation and analysis of phytoplankton variability, *Biogeosciences*. v. 8, p. 881-1899.

FENNEL, K.; HU, J.; LAURENT, A.; MARTA-ALMEIDA, M.; HETLAND, R. 2013. Sensitivity of hypoxia predictions for the Northern Gulf of Mexico to sediment oxygen consumption and model nesting, *J. Geophys. Res. Oceans*. v. 118, p. 990-1002.

FENNEL, K.; LAURENT, A.; HETLAND, R.; JUSTIC, D.; KO, D. S.; LEHRTER, J.; MURRELL, M.; WANG, L.; YU, L.; ZHANG, W. 2016. Effects of model physics on hypoxia simulations for the northern Gulf of Mexico: A model intercomparison. *J. Geophys. Res.* v. 121, doi:10.1002/2015JC011577.

FENNEL, K.; WILKIN, J.; LEVIN, J.; MOISAN, J.; O'REILLY, J.; HAIDVOGEL, D. 2006. Nitrogen cycling in the Mid Atlantic Bight and implications for the North Atlantic nitrogen budget: results from a three-dimensional model. *Glob. Biogeochem. Cycles*.v. 20, GB3007.

FERNIE AR, ROSCHER A, RATCLIFFE RG, KRUGER NJ (2001) Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263

Ferragut, C., Bicudo, D.C. & Vercellino, I.S. 2013. Amostragem e medidas de estrutura da comunidade perifítica. In: A. Schwarzbald, A. Burliga & L.C. Torgan (eds.). *Ecologia do perifíton*. Rima, São Carlos, 157-177 pp.

FIGUEIREDO, J. L. AND N. A. MENEZES. 1978. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. Teleostei (1). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FLORA DO BRASIL 2020 (em construção). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >.

FLÜGEL, E. 2009. Microfacies of carbonate rocks. Elsevier: 983p.

FOLK, R. L.; WARD, W. C. 1957. Brazos River bar: a study in the significance of grain size parameters. *Journal of Sedimentary Research*. 1957.

FRANCINI-FILHO, R. B.; CONI, E. C. O.; MEIRELLES, P. M.; AMADO-FILHO, G. M.; THOMPSON, F. L.; PEREIRA-FILHO, G. H.; BASTOS, A. C.; (...); MOURA, R. L. 2013. Dynamics of coral reef benthic assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. *PLoS ONE* 8:e54260.

GALEHOUSE, J.S. 1971. Sedimentation analysis. In: Carver, R.E., *Procedures in sedimentary petrology*. p. 653.

GALLON, C. Z., FULLER, S. C., FANNING, K., SMYTH, H. E., PUN, S., MARTIN, I. F., O'HARE, T. J. 2013. Increase in β -ionone, a carotenoid-derived volatile in zeaxanthin biofortified sweet corn. *J Agric Food Chem*, 61, 7181-7187.

GIBON Y, BLAESING OE, HANNEMANN J, CARILLO P, HÖHNE M, HENDRIKS JH, PALACIOS N, CROSS J, SELBIG J, STITT M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell Online* 16: 3304-3325

GIULIETTI, A.M., RAPINI, A., ANDRADE, M.J.G., QUEIROZ, L.P., SILVA, J.M.C. (org.) 2009. *Plantas raras do Brasil. Conservação Internacional*, Belo Horizonte.

Golterman, H. L.; Clymo, R. S. & Ohnstad, M. A. M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. 2a ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications. International Biological Program.

GOUDET, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (v. 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

GRAHAM, D. J. & MIDGLEY, N. G. 2000. Graphical representation of particle shape using triangular Diagrams: an Excel spreadsheet method. *Earth Surface Processes and Landforms*, 25: 1473–1477.

Gücker, B; Brauns, M.; Solimini, A. Voss, M.; Walz, N. & Pusch, M.T. (2011). Urban stressors alter the trophic basis of secondary production in an agricultural stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68:74-88

GUIDI, L., CALATAYUD, 2014. A. Non-invasive tools to estimate stress-induced changes in photosynthetic performance in plants inhabiting Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot>.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.* v.8, p.10–14.

GUIMARÃES, S. M. P. B., CRISPINO, L. M. B., NUNES, J. M. C. 2016. *Flora Ficológica do Estado de São Paulo - Phaeophyceae*. RiMa Editora.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>

HAEFNER, P. A., Jr. 1990. Morphometry and size at maturity of *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) in Bermuda. *Bulletin of Marine Science* 46(2): 264-286.

HAIKVOGEL, D. B.; ARANGO, H.; BUDGELL, W. P.; CORNUELLE, B. D.; CURCHITSER, E.; DILORENZO, E.; FENNEL, K.; GEYER, W. R.; HERMMAN, A. J.; LANEROLLE, L.; LEVIN, J.; MCWILLIAMS, J. C.; MILLER, A. J.; MOORE, A. M.; POWELL, T. M.; SHCHEPETKIN, A. F.; SHERWOOD, C. R.; SIGNELL, R. P.; WARNER, J. C.; WILKIN, J. (2008). *Ocean forecasting in*

terrain-following coordinates: formulations and skill assesment of the Regional Ocean Modeling System. *J. Comput. Phys.*v. 227, p. 3595-3624.

HARVEY, A.S. & WOELKERLING, W.J. 2007. A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. *Ciencias Marinas* 33: 411-426.

HEDGES, J.I., STERN, J.H. (1984). Carbon and nitrogen determinations of carbonate containing solids. *Limnology and Oceanography*, 29: 657-663.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station, Circular-347.

HUBERT, J. F. 1962. A zircon-tourmaline-rutile maturity index and the interdependence of the composition of heavy mineral assemblages with the gross composition and texture of sandstones. *Jour. Sed. Petrol.*, v. 32, p. 440-450.

ICMBio. (2017). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (2017). Revista ICMBio em foco, 225: 4. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/downloads/icmbioemfoco445.pdf> (Acesso em 12 de setembro de 2018).

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: www.inmet.gov.br. Acesso em: 04 set. 2018.

Irgang, B.E.; Pedralli, G.; Waechter, J.I. 1984. Macrófitos aquáticos da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. *Roessleria*, Porto Alegre Vol. 6: 395-404.

JAKOBSSON, M., & N. A. ROSENBERG. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23,1801–1806.

JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. Mc Graw Hill. New York.

KOHLER, K.E., GILL, S.M. (2006). Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): a Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. *Computers and Geosciences* 32 (9), 1259–1269.

KRAUSS, K. W.; ALLEN, J. A. 2003. Influences of salinity and shade on seedling photosynthesis and growth of two mangrove species, *Rhizophora mangle* and *Bruguiera sexangula*, introduced to Hawaii. *Aquatic Botany*, v. 77, p. 311–324.

KULLANDER SO, Ferreira E.J.G. 2006. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 17(4):289-398.

- LE HIR, P.; ROBERTS, W.; CAZAILLET, O.; CHRISTIE, M.; BASSOULLET, P.; BACHER, C. 2000. Characterization of intertidal flat hydrodynamics. "Continental Shelf Research".v.20, pp.1433 – 1459.
- LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. 1983. Numerical ecology.Elsevier Fci. Publ., 419 p.
- LICHTENTHALER, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, v.148, p.349-382.
- LIGUS (Laboratoire de l'Institut de Géographie de l'Université de Strasbourg). 1958. Methodé améliorée pour l'étude des sables. Rev. Géom. Dyn, v. IV, p.43-53.
- LITTLER, D.S, LITTLER, M.M. 2000. Caribbean reef plants. An identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico. pp. 1-542. Washington: Offshore Graphics.
- LOBO, E, LEIGHTON, G. 1986. Estructuras comunitarias de lãs fitocenosis planctonicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de La zona central del Chile. Rev. Biol. Mar.; v.22, n.1, p.1-29.
- LOEB, MV, 2012. A new species of Anchoviella Fowler, 1911 (Clupeiformes: Engraulidae) from the Amazon basin, Brazil. Neotropical Ichthyology, 10(1): 13-18.
- LORENZEN, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. Limnology and Oceanography, v. 12, p. 343-346.
- LOVEGROVE, T., (1962). The effects of various factors on dry weight values. Rapp. P. Réun. Cons. Int. Explor. Mer, 153: 86-91.
- LUND J.W.G., KIPLING C., LE CREN E.D. (1958) Hydrobiologia. 11(2): 143-170.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & Le-Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. Hydrobiologia 11: 143-170.
- LUQUE, R., SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra pelo azul de alcião 8GS ou 8GX. Acta Botanica Brasilica, v. 10, n. 2, p. 199-212.
- Mackereth, F.J.H; Heron, J.; Talling, J. F. (1978). Water Analysis: some revised methods for limnologists. Freshwater biological association. Scientific publication n° 36. 120p
- MADIN, L.P., CETTA, C.M. E MCALISTER, V.L.,1981. Elemental and Biochemical composition of salps (Tunicata: Taliacea). Mar. Biol., 63: 217-226.
- Mancini, P. L., L. Bugoni. 2014. Resources partitioning by seabirds and their relationship with other consumers at and around a small tropical archipelago. ICES Journal of Marine Science 71: 2599–2607.

- MANEVELDT, G.W. & VAN DER MERWE 2012. *Heydrichia cerasina* sp. nov. (Sporolithales, Corallinophycidae, Rhodophyta) from the southernmost tip of Africa. *Phycologia* 51: 11–21.
- MANGOS, T.J., BERGER, R.G. 1997. Determination of major chlorophyll degradation products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, Berlin, v.204, p.345-350.
- MARCENIUK, AP, BETANCUR-R, R, ACERO, A, MURIEL-CUNHA J. 2012. Review of the Genus *Cathorops* (Siluriformes: Ariidae) from the Caribbean and Atlantic South America, with Description of a New Species. 1: 77–97.
- MARCENIUK, AP. 2005. Chave para identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da costa brasileira. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 31(2): 89 – 101.
- MARCHESIELLO, P.; McWILLIAMS, J. C.; SHCHEPETKIN, A. F. 2001. Open boundary conditions for long-term integration of regional ocean models. *Ocean Model*.v. 3, p. 1-20.
- Margalef, R. (1983). *Limnologia*. Barcelona: Omega.
- MARIE D., RIGAUT-JALABERT F., VAULOT, D. (2014). An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry* 85, 962–968.
- MARTINELLI, G., MORAES, M.A. 2013. Livro vermelho da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br>.
- MATHER, A.; STRETCH, D.; GARLAND, G. 2011. Predicting extreme wave run-up on natural beaches for coastal planning and management. *Coastal Engineering Journal*, v. 53, p. 87-109.
- MCDUGALL, T.J.; BARKER, P.M. 2011. Getting started with TEOS-10 and the Gibbs Seawater (GSW) Oceanographic Toolbox, 28pp., SCOR/IAPSO WG127, ISBN 978-0-646-55621-5.
- McEWEN, G.F.; JOHNSON, M.W.; FOLSOM, T.R. 1954. A statistical analysis of the performance of the Folsom plankton sample splitter, based upon test observations. *Archives of Meteorology, Geophys and Bioklimatology*, (Ser. A), N.7, P.502-527.
- MELO, G.A.S. 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos, siris) do litoral brasileiro. Plêiade / FAPESP, São Paulo, SP, Brasil, 640p.
- MELO, G.A.S. 1999. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda do litoral Brasileiro: Anomura, Thalassinidea, Palinuridea, Astacidea. São Paulo, Editora Plêiade/FAPESP, 551 p.
- MENEZES N.A., NIRCHIO M, DE OLIVEIRA C, Siccharamirez R. 2015. Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. *ZOOTAXA*. 3918(1):1.
- MENEZES, L.F.T., ARAUJO, D.S.D. 1999. Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da restinga de Marambaia-RJ. *Acta Botanica Brasilica* 13(2): 223-235

- MENEZES, N. A. AND J. L. FIGUEIREDO. 1980. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. Teleostei (3). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MOSER, H.G. 1996. The early stages of fishes in the California Current Region. La Jolla, Calcofi. Atlas no. 33. 1505 pp.
- MOURA RL, LINDEMAN KC. 2007. A new species of snapper (Perciformes: Lutjanidae) from Brazil, with comments on the distribution of *Lutjanus griseus* and *L. apodus*.
- MUELLER-DOMBOIS, D., ELLENBERG, H. 1974. Aims and methods of vegetation ecology. John Wiley & Sons, New York. 547p.
- NASSAR, C.G.A.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; MAURAT, M.C.S., FALCÃO, C.; MITCHELL, G.J.P. 1989. Feofíceas do litoral norte do estado do Espírito Santo. *Ínsula* 19: 143-168.
- NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON, M.V.H. 2016. Fishes of the world. 5a edição. John Wiley & Sons. New Jersey.
- NEVEUX J., LANTOINE F. (1993). Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea Res. I* 40(9): 1747-1765.
- NUNES-NESE A, CARRARI F, GIBON Y, SULPICE R, LYTOVCHENKO A, FISAHN J, GRAHAM J, RATCLIFFE RG, SWEETLOVE LJ, FERNIE AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50: 1093-1106
- OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 1998. OECD series on principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring Number 1. ENV/MC/CHEM (98)17, 26.01.1998.
- OEDC. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013. Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixes (FET), OECD 236, 26.07.
- OGAWA, E.F., ROCHA, C.A.S. 1976. Sobre a fecundidade de crustáceos decápodos marinhos do Estado do Ceará, Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 16, n. 2, p. 101-104.
- PAWLOWICZ, R.; BEARDSLEY, B., LENTZ, S. 2002. "Classical Tidal Harmonic Analysis including Error Estimates in MATLAB using T_TIDE", *Computers and Geosciences*, v.28, pp.929-937.
- PEIRCE, M.A., & PRINCE, P.A. (1980). *Hepatozoon albatrossi* sp. nov. (Eucoccida: Hepatozoidae) from *Diomedea* spp. in the Antarctic. *Journal of Natural History* 14: 447–452.
- PÉREZ FARFANTE, I., 1970. Diagnostic characters of juveniles of the shrimps *Penaeus aztecus aztecus*, *P. duorarum duorarum*, and *P. brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Spec. Sci. Rep. Fish.*, 599: 1-26.

- PERRY, C. T. 2005. Morphology and occurrence of rhodoliths in siliciclastic, intertidal environments from a high latitude reef setting, southern Mozambique. *Marine Geology* 214: 143–161.
- PETTJONH, F.J. 1957. *Sedimentary rocks*: New York, Harper e Bros. p.718.
- PHILLIPS, D.L., NEWSOME, S.D., GREGG, J.W. 2005. Combining sources in stable isotope mixing models: alternative methods. *Oecologia* 144: 520-527.
- Pielou, E. C. (1975). *Ecological diversity*. New York: Wiley,.
- PINHEIRO, H. A., BORGES, R., E CENTENO, D. C. (2004). Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16:69-76.
- POCHON X., PAWLOWSKI J., ZANINETTI L., ROWAN R. (2001). High genetic diversity and relative specificity among Symbiodinium-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar. Biol.* 139(6): 1069-1078.
- PORRA R, THOMPSON W, KRIEDEMANN P (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 975: 384-394.
- PRITCHARD, J.K, STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- PROPS R., MONSIEURS P., MYSARA M., CLEMENT L., BOON N. (2016) Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. *Meth. Ecol. Evol.* 7(11): 1376-1385.
- QUIGLEY K.M., WILLIS B.L., BAY L.K. (2016). Maternal effects and Symbiodinium community composition drive differential patterns in juvenile survival in the coral *Acropora tenuis*. *Royal Society Open Science* 3(10): 160471.
- R CORE TEAM. (2018). R: a language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>
- RALPH PJ, GADEMANN R (2005) Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat Bot* 82:222–237
- REIS, V.M.D.; KAREZ, C.S.; MARIATH, R.; de MORAES, F.C.; de CARVALHO, R.T.; BRASILEIRO, P.S. et al. 2016. Carbonate production by benthic communities on shallow coralgal reefs of Abrolhos Bank, Brazil. *PLoS ONE* 11(4): e0154417.
- RICHARDS, W.J. 2006. *Early stages of atlantic fishes: an identification guide for the Western North Atlantic*. Volume I. and Volume II. CRC Press, Boca Raton, Florida: 2640 p.
- RIVAS LR. 1986. *Systematic Review of the Perciform Fishes of the Genus Centropomus*.

- ROSENBERG, N.A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Resources* 4: 137–138.
- RUGGIERO, P.; KOMAR, P.D.; McDOUGAL, W.G.; MARRA, J.J.; BEACH, R.A. 2001. Wave runup, extreme water levels and erosion of properties backing beaches. *Journal of Coastal Research*, 17: 2.
- RUSU, L., BERNARDINO, M., GUEDES, S. C. 2011. Modelling the influence of currents on wave propagation at the entrance of the Tagus estuary. "Ocean Engineering".
- Sant'Anna C.L. et. al. (2008). Reviel of toxic speies of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*. v.126, p.251-265.
- Sartory, D.P. & Grobbelaar, J.E. 1984. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, 114:177-187.
- SAUNDERS, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1879–88.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y., CINTRON, G. 1986. Guia para estudo de áreas de manguezal, estrutura, função e flora. *Caribbean Ecological Research*, São Paulo, 150p.
- SHÄDEL C, BLÖCHL A, RICHTER A, HOCH, G. 2010. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 1-8.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Silva et al. 2014
- SILVA, F. de A.S.E., AZEVEDO, C.A.V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: *World Congress on Computers in Agriculture*, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- SIMONELLI, M., FRAGA, C. N. 2007. Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. Vitória: Ipema.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- SINNECKER, P., BRAGA, N., MACCIONE, E.L.A., LANFER-MARQUEZ, U.M. 2005. Mechanism of soybean (*Glycine max* L. Merrill) degreening related to maturity stage and postharvest drying temperature. *Postharvest Biology and Technology*, v.38, pp.269-279.

- SLATKIN, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- SMITH, A.R., PRYER, K.M., SCHUETTEL, E., KORALL, P., SCHNEIDER, H., WOLF, P.G. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705-731.
- SOUZA, L. S., COGO, N. P., VIEIRA, S. R. 1997. Variabilidade de propriedades físicas e químicas do solo em um pomar cítrico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 21, p.367-372.
- STAT M., BIRD C.E., POCHON X., CHASQUI L., CHAUKA L.J., CONCEPCION G.T., ... GATES R.D. (2011). Variation in Symbiodinium ITS2 sequence assemblages among coral colonies. *PLoS One* 6(1): e15854.
- STEHMANN, M.F.W. 2002 "Proposal of a maturity stages scale for oviparous and viviparous cartilaginous fishes (Pisces, Chondrichthyes)." *Archive of Fishery and Marine Research* 50.1
- STOCKDON, H. F.; HOLMAN, R. A.; HOWD, P. A.; SALLENGER, A. H. 2006. Empirical parameterization of setup, swash, and runup. *Coastal engineering*, n.7, v. 53, p. 573-588.
- STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M., QIANG, S., GOLTSEV, V. 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797;1313–1326.
- Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Ottawa, Fisheries Research Board of Canada: 310.
- Thiers, B. 2016 [continuously updated]. In: Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em <<http://sweetgum.nybg.org/ih/>>. Acesso em 22 novembro 2016.
- TITSCHACK, J.; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J. 2011. Magnesium quantification in calcites [(Ca,Mg)CO₃] by Rietveld-based XRD analysis: Revisiting a well-established method. *American Mineralogist*. 2011; 96 (7):1028–1038.
- TOMAS C.R. (1997) *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego, CA: Academic Press, 858p.
- TORRENCE, C.; COMPO, G. P. 1998. A practical guide to wavelet analysis. *Bulletin of the American Meteorological Society*, v.79, n.1, p.61-78.
- Uehlinger, V. (1964). Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences* 17: 121-123.
- UMLAUF, L.; BURCHARD, H. 2003. A generic length-scale equation for geophysical turbulence models. *J. Marine Res.* v. 61, p. 235-265,.

- UNDERWOOD, A.J. 1997. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press.
- Utermohl, H. (1958). Zur Vervollkomnung der quantitative phytoplankton: metodik. Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie 9: 1-38.
- VAN DER MERWE, E. 2015. "Systematics of the non-geniculate coralline red algae from the South African south coast". PhD thesis, University of the Western Cape, Bellville, 344 pp.
- VANZAN M., BARRERA-ALBA J.J., TENÓRIO M.M.B., TENENBAUM D.R. (2015) Picoplankton and nanoplankton variability in an Antarctic shallow coastal zone (Admiralty Bay) during the austral summer of 2010/2011. Polar Biol. 38:1-18.
- VIEIRA, BB, 1947. Observações sobre a maturação de *Xiphopenaeus kroyeri* no litoral de São Paulo. Boletim do Museu Nacional 74: 1-22.
- VIEIRA, S. R. 2000. Geoestatística em estudos de variabilidade especial do solo. In: NOVAIS, P. F., ALVARES, V. H., SCHAEFER, C. E. G. R. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p. 1-54.
- VIEIRA, S. R., HATFIELD, J. L., NIELSEN, D. R., BIGGAR, J. W. 1983. Geostatistical theory and application to variability of some agronomical properties. Hilgardia, v.51, p.1-15,
- WALBERG, J. (2001). White blood cell counting techniques in birds. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 10: 72-76.
- WARNER, J. C; SHERWOOD, C. R.; ARANGO, H. G.; SIGNELL, R. P. 2005. Performance of four Turbulence Closure Methods Implemented using a Generic Length Scale Method. Ocean Modelling. v. 8, p. 81-113.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358–1370.
- WESSLANDER K., P. HALL, S. HJALMARSSON, D. LEFEVRE, A. OMSTEDT, A. RUTGERSSON, E. SAHLÉE AND A. TENGBERG (2011) Observed carbon dioxide and oxygen dynamics in a Baltic Sea coastal region. Journal of Marine Systems, 86: 1–9.
- WOELKERLING, W.J. Irvine, L.M.; Harvey, A. 1993. Growth-forms in non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). Australian Systematic Botany 6: 277-293.
- WOELKERLING, W.J., 1988. The coralline red algae : an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. British Museum (Natural History), London and Oxford University Press, Oxford, 268 pp.
- WRIGHT, S. (1949). The genetical structure of populations. Annals of Human Genetics 15: 323–354.

WYNNE, M.J. 2011. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision. Nova Hedwigia Beihefte 140: [1] 7-166.

YEH, F.C., YANG, R.C., BOYLE, T.B., YE, Z.H., MAO, J.X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Canada, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.

YOON, H. S.; HACKETT, J. D.; BHATTACHARYA, D. 2002. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(18): 11724–9.

6. APÊNDICE

**Programa de Ensaio de Proficiência da Rede Metrológica de Minas
Gerais – RMMG Meio ambiente – água e efluente**

Escritório de Projetos

Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro

Patrícia Bourguignon Soares

Armando Biondo Filho

Paulo Roberto Filgueiras

Valdemar Lacerda Junior

Walter Luiz Alda Junior

Roberta Quintino Frinhani Chimin

Vitória,

Outubro de 2019

ESCOPO

O objetivo deste relatório é apresentar um resumo da participação dos laboratórios que compõem a Rede Rio Doce Mar (RRDM) no Programa de Ensaio de Proficiência da Rede Metrológica de Minas Gerais (RMMG). Rede acreditada pela CGCRE, desde maio de 2018, como Provedor de Ensaio de Proficiência conforme a norma ABNT NBR ISO/IEC 17043. A participação dos laboratórios da RRDM em atividades de ensaio de proficiência é um dos mecanismos de controle da qualidade dos resultados previstos na NBR ISO/IEC 17025. Um dos grandes benefícios advindos desta participação é a avaliação externa e independente da qualidade de seus resultados de ensaios.

LABORATÓRIOS PARTICIPANTES

Quadro 1. Laboratório da RRDM participante do Programa de Ensaio de Proficiência da RMMG.

Código da RMMG	Laboratório	Responsáveis	Contato
AA06GCK	LEA - LabPetro	Maria Tereza e Geisamanda	mariacarneiro@hotmail.com geisamanda@gmail.com
AA06BLN	LEC-UFMG	Vanya e Carolina	combustiveis@qui.ufmg.br
AA06TS7	Laboratório de Determinações-FURG	Adalto	adaltobianchini@furg.br
AA06P69	Laboratório LABGAM-Oceanografia	Fabian Sá e Renato Neto	fabiannetuno@gmail.com

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os laboratórios LEA-LabPetro e LEC-UFMG apresentaram desempenho satisfatório para análise de todos os metais (Quadro 2). O Laboratório de Determinações-FURG apresentou desempenho questionável para a análise de um importante metal, o ferro. Ademais apresentou desempenho insatisfatório para cádmio, cromo, manganês e zinco, sendo os três primeiros muito importantes para análise de águas contaminadas pela lama de rejeito da mineração. O Laboratório LABGAM-Oceanografia apresentou desempenho questionável para a análise de chumbo e desempenho insatisfatório para cromo e ferro. Este último muito importante para análise de águas contaminadas pela lama de rejeito da mineração.

Quadro 2. Resultados dos laboratórios da RRDM para análise de metais.

Ensaio	AA06GCK (LEA – LabPetro)	AA06BLN (LEC-UFMG)	AA06TS7 (Laboratório de Determinações-FURG)	AA06P69 (Laboratório LABGAM-Oceanografia)
Bário	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
Cádmio	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Satisfatório

Ensaio	AA06GCK (LEA – LabPetro)	AA06BLN (LEC-UFMG)	AA06TS7 (Laboratório de Determinações- FURG)	AA06P69 (Laboratório LABGAM- Oceanografia)
Chumbo	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Questionável
Cobre	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
Cromo	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Insatisfatório
Ferro	Satisfatório	Satisfatório	Questionável	Insatisfatório
Manganês	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Satisfatório
Níquel	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
Zinco	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Satisfatório

Estabilidade é a capacidade do instrumento de medição de conservar suas características metrológicas. A estabilidade de um instrumento é obtida através da medição repetida, em momentos diferentes, com o mesmo instrumento e sobre a mesma amostra. Representa a quantidade de variação total na tendência do sistema ao longo do tempo. Os fatores que podem afetar a estabilidade são: desgaste do instrumento de medição; mudança de temperatura; e umidade. Levando em consideração o curto espaço de tempo para os ensaios do PEP, o principal fator a provocar a estabilidade nos ensaios é o desgaste do instrumento de medição.

O laboratório LEC-UFMG apresentou desempenho satisfatório para estabilidade no ensaio de todos os metais. O laboratório LEA-LabPetro apresentou desempenho satisfatório para estabilidade no ensaio de todos os metais, exceto para o ensaio de cádmio (Quadro 3). O Laboratório de Determinações-FURG apresentou desempenho insatisfatório para a estabilidade nos ensaios de cádmio, ferro, manganês e zinco. Adicionado aos desempenhos insatisfatórios (exceto para o ferro cujo desempenho foi questionável) para os mesmos metais, os resultados do Laboratório de Determinações-FURG podem ser questionados quanto a sua validade durante a elaboração de relatórios. O Laboratório LABGAM-Oceanografia apresentou desempenho questionável para a estabilidade no ensaio de chumbo e desempenho insatisfatório para ferro. Os resultados para ensaio de ferro pelo LABGAM-Oceanografia são insatisfatórios.

O LEA – LabPetro seguiu os métodos para ensaios recomendados pela RMMG e seus resultados foram satisfatórios. De forma oposta, o LEC-UFMG não utilizou nenhum dos métodos recomendados pela RMMG para os ensaios, entretanto seus resultados foram todos satisfatórios. Estes resultados sugerem que a metodologia adotada pelo LEC-UFMG pode ser uma boa alternativa para a Rede.

Quadro 3. Resultados dos laboratórios da RRDM para estabilidade na análise de metais.

Ensaio	AA06GCK (LEA – LabPetro)	AA06BLN (LEC-UFMG)	AA06TS7 (Laboratório de Determinações- FURG)	AA06P69 (Laboratório LABGAM- Oceanografia)
Estabilidade (Cádmio)	Questionável	Satisfatório	Insatisfatório	Satisfatório
Estabilidade (Chumbo)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Questionável
Estabilidade (Ferro)	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Insatisfatório
Estabilidade (Manganês)	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Satisfatório

Ensaio	AA06GCK (LEA – LabPetro)	AA06BLN (LEC-UFMG)	AA06TS7 (Laboratório de Determinações-FURG)	AA06P69 (Laboratório LABGAM-Oceanografia)
Estabilidade (Níquel)	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório	Satisfatório
Estabilidade (Zinco)	Satisfatório	Satisfatório	Insatisfatório	Satisfatório