Guia técnico de monitoramento dos efeitos ambientais em corpos hídricos

Tatiana Heid Furley
& Clayton Perônico (Ed.)

INSTITUTO APLYSIA

Guia técnico de monitoramento dos efeitos ambientais em corpos hídricos

Tatiana Heid Furley & Clayton Perônico (Ed.)

peixeguia
monitoramento ambiental

Tatiana Heid Furley
& Clayton Perônico (Ed.)

Guia técnico de monitoramento dos efeitos ambientais em corpos hídricos

1ª. Edição
Vitória – ES, 2015

peixeguia
monitoramento ambiental

INSTITUTO APLYSIA

Edição e organização
Tatiana Heid Furley
Clayton Perônico

Texto
Adriana Regina Chippari Gomes
Claudio Dalle Olle
Clayton Perônico
Fernando Aquinoga
Francisco Candido Cardoso Barreto
Jairo Oliveira
Joanne Louise Parrott
Karla Gonçalves da Costa
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick
Larry Mark Hewitt
Marcelo Paes Gomes
Mark Ervin McMaster
Priscylla da Mata Pavione
Tatiana Heid Furley
Thiago Holanda Basilio
Vinícius Dadalto Baroni

Fotografia de capa
Leonardo Merçon

Fotografias internas
APLYSIA
Joarley Rodrigues
Karla Costa
Leonardo Merçon
Priscylla da Mata Pavione

Projeto Gráfico e Diagramação
Felipe Gomes
Wérllen Castro

Revisão do Texto
Paulo Gois Bastos

Revisão Técnica
Instituto APLYSIA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte – CIP
Jorge Santa Anna (Bibliotecário/Profissional da Informação)

CDD: 577
G943

Guia técnico de monitoramento dos efeitos ambientais em corpos hídricos / Tatiana Heid Furley e Cleiton Perônico (Ed.). – Vitória: Instituto Aplysia, 2015.
264 p.: il.; 16,5 cm.

Inclui índice remissivo e bibliografia.
ISBN 978-85-5642-000-8 (enc.)

1. Monitoramento ambiental. 2. Efeitos ambientais. 3. Protocolo ambiental. 4. Recursos hídricos. I. Furley, Tatiana Heid. II. Perônico, Cleiton. III. Instituto Aplysia. IV. Título.

As informações contidas nesta publicação poderão ser reproduzidas, em parte ou no total, para propósitos pessoais ou públicos não comerciais, sem necessidade permissão e pagamento.

Você deverá: ① Indicar tanto o título completo do material reproduzido bem como os editores; ② Indicar que a reprodução é uma cópia do trabalho oficial que foi publicado; ③ Indicar que a reprodução não foi realizada em afiliação com ou com o endosso dos editores deste documento.

A reprodução comercial e distribuição são proibidas, exceto se realizadas com a permissão por escrito dos editores desta publicação.
Para maiores informações, por favor contate o Instituto APLYSIA no telefone 27 3337 4877 ou no e-mail tatiana@institutoaplysia.org

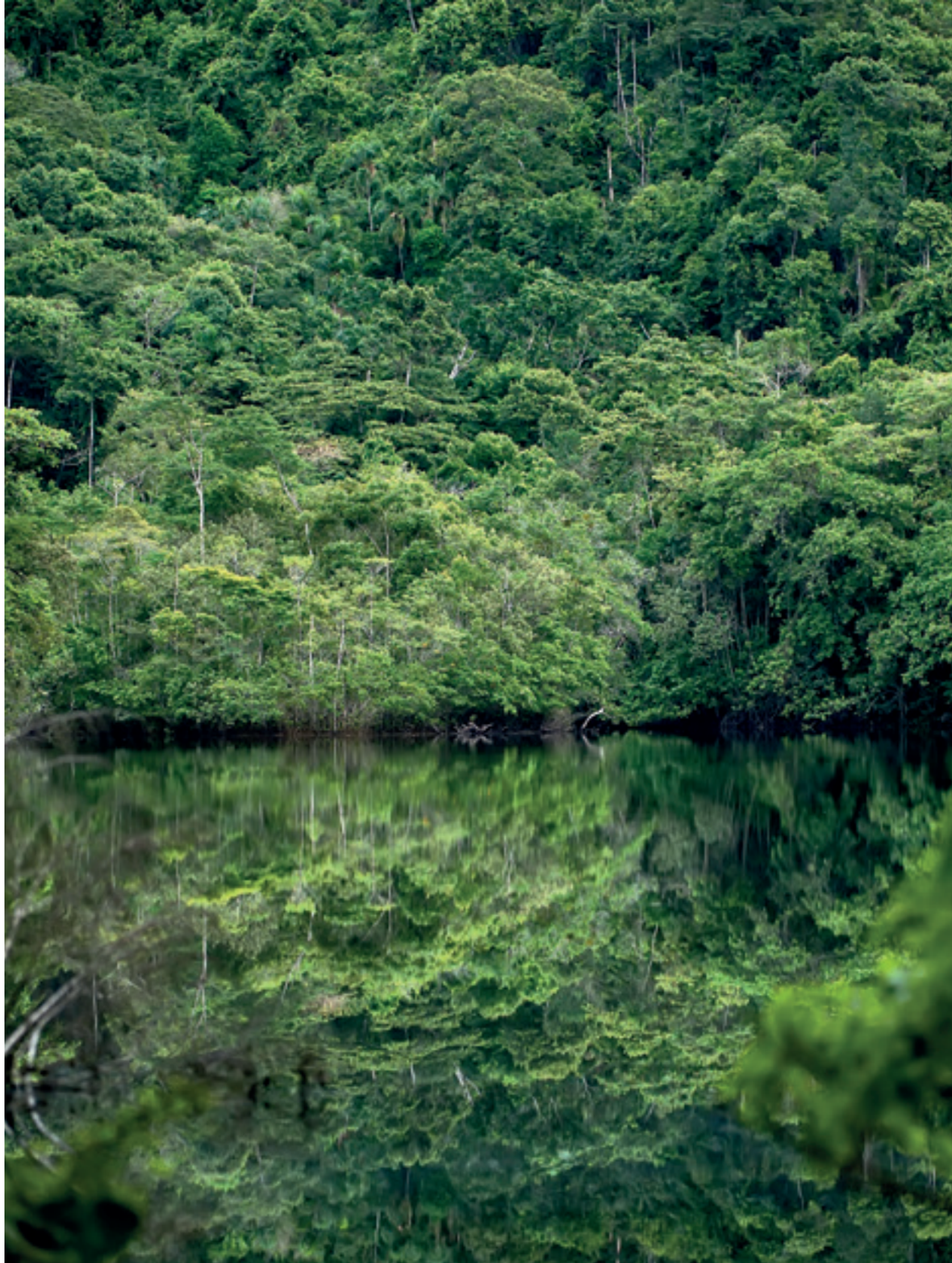
---

OBJETIVO O objetivo deste documento é fornecer um Guia Técnico de Monitoramento dos Efeitos Ambientais em Recursos Hídricos baseado na experiência da Environment Canada (Agência Ambiental Federal Canadense) e adaptado à realidade das condições tropicais do Brasil.

PÚBLICO ALVO Espera-se que este Guia seja utilizado como referência pelas agências ambientais, instituições de ensino e pesquisa públicas e privadas, indústrias e sociedade.

NOTA TÉCNICA Deve ser enfatizado que as metodologias dispostas neste documento guia não constituem uma exaustiva lista das possíveis maneiras de se avaliar os efeitos ambientais. Assume-se aqui que o líder de cada capítulo deste guia tem conhecimento suficiente para aplicar às recomendações realizadas pelo guia canadense de monitoramento de efeitos ambientais e aliar as práticas científicas possíveis de serem realizadas no Brasil. Informações adicionais e documentos estão disponíveis no website do Instituto APLYSIA: www.institutoaplysia.org

AGRADECIMENTOS O Instituto APLYSIA gostaria de agradecer todas as pessoas que não mediram esforços e contribuíram voluntariamente para a realização do Projeto Peixe Guia e para a elaboração desse Guia Técnico. A lista completa com o nome dos integrantes da equipe encontra-se no final deste documento.



ACRÔNIMOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Afnor	Association Française de Normalisation
ANA	Agência Nacional de Águas
Aoac	Association of Analytical Communities
APHA	American Public Health Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
AWWA	American Water Works Association
Baci	Avaliação do Impacto Antes e Depois do Controle
BPL	Boas Práticas de Laboratório
C-I	Controle-Impacto
CAT	Catalase
CBH-ES	Comitês de Bacias Hidrográficas no Estado do Espírito Santo
Ce_{50}	Concentração Efetiva
Ceno	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
Cesan	Companhia Espírito Santense de Saneamento.
Cetesb	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CI_{50}	Concentração Letal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Conama	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
Cpue	Cálculos da Captura pela Unidade de Esforço
CQ	Controle de Qualidade
CRI	Canadian Rivers Institute
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCQS	Delineamento de Controle de Qualidade do Serviço
DP	Desvio Padrão
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EEM	Environmental Effects Monitoring
Elap	Environmental Laboratory Approval Program
EP	Erro Padrão
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESP	Ecological Services Fro Planning
ETE	Estações de Tratamento de Efluente
GQ	Garantia de Qualidade
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
Hucam	Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes
ICMS	Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços
Iema	Instituto Estadual do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Ifes	Instituto Federal do Espírito Santo
IGS	Índice Gonadossomático
IHS	Índice Hepatossomático
Inmetro	Instituto Nacional Metrologia Norma Qualidade Industrial
ISO	International Organization for Standardization
ISSQN	Imposto sobre o Serviço de Qualquer Natureza
K	Fator de Condição
MEA	Monitoramento de Efeitos Ambientais
MEC	Ministério da Educação
O_2-	Ânion Superóxido
OD	Oxigênio Dissolvido
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OH	Radicais Hidroxilo
ORP	Potencial de Oxidação/ Redução
PNQA	Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das Águas
PNRH	Política Nacional de Recursos Hídricos
POPs	Procedimentos Operacionais Padronizados
RCA	Condições de Referência
Seama	Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Sebrae	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
Secttti	Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia, Inovação, Educação Profissional e Trabalho do Espírito Santo
Sema	Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Guarapari
Seman	Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Anchieta
Semdesu	Secretaria Municipal de Desenvolvimento Sustentável de Vila Velha
Semmam	Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Vitória
TEC	Tamanho do Efeito Crítico
U.S. EPA	Environmental Protection Agency of United States
Ufes	Universidade Federal do Espírito Santo
UNB	Universidade de New Brunswick
UVV	Universidade de Vila Velha
VC	Valor Crônico
VCest	Valor Crônico Estimado
WEF	Water Environment Federation

peixeguia
monitoramento ambiental

APRESENTAÇÃO

Peixe Guia

> *O acesso à água potável e segura é um direito humano essencial, fundamental e universal, porque determina a sobrevivência das pessoas e, portanto, é condição para o exercício dos outros direitos humanos.* (Papa Francisco sobre o Cuidado com a Casa Comum)

Problematização

Embora já se saiba que o planejamento é fundamental em qualquer gestão, teimamos por aprender pela "pedagogia da catástrofe", como diria o Prof. Christovam Buarque, ou seja, o aprendizado pela dor. É o caso destes últimos anos, em especial os de 2013 a 2015 (quando é realizado o Projeto Peixe Guia), em que a crise da água se mostrou também para o sudeste do Brasil, como já vinha se mostrando, há muito tempo, para o nordeste brasileiro.

O que nos salta aos olhos é que, se queremos sustentabilidade, por que o planejamento, de médio e longo prazo, não é priorizado? "O cuidado dos ecossistemas requer uma perspectiva que se estenda para além do imediato, porque, quando se busca apenas um ganho econômico rápido e fácil, já ninguém se importa realmente com a sua preservação" (Encíclica Laudato Si do Papa Francisco, verso 36).

Muitos especialistas já afirmaram que por trás da crise hídrica existe a dificuldade do sistema de gestão pública em articular e conciliar as muitas demandas de diferentes consumidores. Ainda que "todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações" (Artigo nº 225 da Constituição da República Federativa do Brasil), mesmo assim estamos presenciando a falta de atenção com os ecossistemas aquáticos, isto é, a água dos oceanos, rios, córregos e lagoas, sua fauna e sua flora.

Imagens tiradas durante as amostragens do Projeto Peixe Guia retratando a figura do peixe e a sua relevância econômica e ecológica.

Apesar de a Política Nacional de Recursos Hídricos, Lei nº 9.433/1997, estabelecer que a gestão da água deva se orientar por bacia hidrográfica e que a água passa a ter valor econômico, valendo-se os gestores de instrumentos legais, tais como, os planos de recursos hídricos, o enquadramento dos corpos de água em classes, a outorga dos direitos de uso de recursos hídricos, a cobrança pelo uso de recursos hídricos, a compensação aos municípios e o rateio dos custos de obras, as experiências mostram que o planejamento e o gerenciamento ambiental de bacias hidrográficas não estão equacionados.

O enquadramento busca "assegurar às águas qualidade compatível com os usos mais exigentes a que forem destinadas" e a "diminuir os custos de combate à poluição das águas, mediante ações preventivas permanentes" (Art. 9º da Lei nº 9.433/1997). O enquadramento é referência para os outros instrumentos de gestão de recursos hídricos (outorga e cobrança) e instrumentos de gestão ambiental (licenciamento e monitoramento).

Os instrumentos legais, por sua vez, devem se basear em técnicas e métodos científicos que promovam assertividade e resolutividade, acompanhados da adequada racionalização. O enquadramento dos recursos hídricos, em especial, requer que sejam "ouvidos" os muitos aspectos, dimensões e interesses envolvidos na gestão de tais recursos.

Diante deste cenário, o Projeto Peixe Guia propõe ao Estado do Espírito Santo, e mesmo ao Brasil, um método de efetiva avaliação da qualidade das águas, tomando como protagonista o peixe presente no recurso a ser avaliado.

Por que o Peixe?

> *A água é um elemento simbólico demais porque não está só no viver de cada dia, vai da sobrevivência básica ao etéreo, é emoção, existência, essência. A falta dela deixa tudo em suspenso. Tem cor de ameaça, pega fundo no peito. É humilhante.*
> (Amália Safatle, editora da Revista Página 22)

A saúde dos componentes de um ecossistema resulta na saúde do ecossistema como um todo, bem como na saúde dos que se utilizam do mesmo. O peixe reúne e resume todos os aspectos determinantes da saúde de um recurso hídrico e, portanto, é relevante para avaliar e/ou monitorar a sua qualidade, sob as dimensões da sustentabilidade (ecológica, social, econômica e cultural).

Foto dos parceiros do Projeto Peixe Guia, tirada em dezembro de 2013, na partida do projeto realizado no estuário do Rio Benevente.

Foto dos parceiros do Projeto Peixe Guia, tirada em dezembro de 2013, na partida do projeto realizado no estuário do Rio Santa Maria da Vitória.

Foto tirada em abril de 2015 durante apresentação dos resultados aos parceiros do Projeto Peixe Guia.

Quanto de nossa cultura está representada na figura do peixe, dando significados na linguagem, nos costumes, nas artes, no desenvolvimento e no imaginário dos povos.

Como alimento sua relevância socioeconômica fez e faz a sustentação das atividades humanas ao longo de toda a sua evolução.

E como principal elo de uma cadeia ecológica aquática indica a saúde do meio aquático.

Sustentabilidade e Inovação

Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.
(Lavoisier)

Sustentabilidade e inovação, palavras da moda. Ainda que nada modernas, porque são da natureza. Portanto é coisa de "desde que o mundo é mundo". O novo deveria ser a atenção para, cada vez mais, fomentar a inovação, imitando a natureza naquilo que ela nos ensina para manter a vida. Enfim, como se sustentar sem adubar, sem reproduzir, sem se adaptar, sem se mexer, enfim sem inovar? Em especial copiar da natureza o seu método de inovação, qual seja, o de reunir e contar

com os seus muitos elementos e seres atuando na produção e oferta de produtos e serviços, no cuidado da "casa comum", na manutenção da vida. Infelizmente não é isso que estamos assistindo. Pelo contrário, da natureza tiramos e muito pouco acrescentamos para ela se "re(i) novar". Então, no Peixe Guia, articular e reunir os interessados, essa é a Inovação.

Reunir as competências e interesses

Nada se pode desenvolver se não pela troca de conhecimento e recursos disponíveis na sociedade. (Robson Melo)

Qual a melhor solução para um determinado problema, se este possui muitas perspectivas, maneiras de ser visto e analisado? O que é um grande problema para um pode não ser assim tão grande para outro. Ou a sua solução pode se basear numa boa vivência do problema, mas não em todas as vivências possíveis. Olhar algo e enxergar tudo o que nele contém depende do ponto de vista do qual se olha. E será que de um, ou dois, ou três pontos de vista, temos todas as possibilidades de compreender um problema?

Sendo um rio, ou uma lagoa, ou mesmo o mar, os objetos da observação e análise, como todo e qualquer ecossistema, é inconcebível não reunir os interesses e competências para busca de solução de seus problemas. Desta premissa é que o Instituto APLYSIA partiu para o desenvolvimento do Projeto Peixe Guia, reunindo experiência já existente no Canadá, com o conhecimento acadêmico e o conhecimento tradicional, com os interesses da sociedade por água de qualidade, com o interesse empresarial de racionalizar os custos deste insumo básico e com o interesse dos órgãos de controle ambiental por melhoria dos instrumentos de gestão pública dos recursos hídricos.

E assim se desenvolveu o Peixe Guia, projeto cujo produto está materializado neste Guia. Reúnem-se nesta cooperação e compartilhamento de recursos e saberes: a sociedade civil organizada (ou seja, o Terceiro Setor), através do Instituto APLYSIA, o Canadian Rivers Institute, o Instituto Terra, o Instituto Últimos Refúgios, as comunidades de pescadores, Comitês de Bacias Hidrográficas (Rios Jucu e Benevente); as empresas (Segundo Setor) Cesan, Samarco, ArcelorMittal Tubarão, APLYSIA, Vale, Espírito Santo em Ação, Gráfica GSA, além do Sebrae; a Academia, através de Ifes, Ufes e UVV e Universidade de New Brunswick; e o Poder Público (Primeiro Setor) por meio da Agência Ambiental Federal Canadense, da Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação do Espírito Santo, das Prefeituras de Vitória, de Vila Velha, de Guarapari e de Anchieta, através de suas Secretarias de Meio Ambiente, do Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (Iema) e do CNPq.

Robson Melo
Diretor de Relações Institucionais do Instituto APLYSIA

SUMÁRIO

1 Visão geral do modelo de monitoramento ambiental p20

2 Revisão dos efeitos ambientais causados pela poluição industrial, doméstica e agrícola p44

3 Delineamento do estudo e caracterização do local p62

4 Efeitos nos peixes e nos recursos pesqueiros p92

5 Efeitos no habitat: comunidade de invertebrados bentônicos p130

6 Caracterização de efluentes e monitoramento da qualidade da água p154

7 Ensaios ecotoxicológicos crônicos p184

8 Monitoramento do sedimento p204

9 Avaliação dos dados e interpretação p220

Figuras e Tabelas p241
Índice Remissivo p243
Referências Bibliográficas p245

1 Visão geral do modelo de monitoramento ambiental

Tatiana Heid Furley
Clayton Perônico
Fernando Aquinoga
Mark Ervin McMaster
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick
Larry Mark Hewitt

1.1 **Por que um Guia de Monitoramento Ambiental?** p23

1.2 **Projeto Peixe Guia** p24

1.3 **Descrição do Guia Técnico de Monitoramento de Efeitos Ambientais em Recursos Hídricos (MEA)** p29

1.3.1 Caracterização do Efluente p31
1.3.2 Avaliação de Toxicidade Crônica p31
1.3.3 Monitoramento da Qualidade da Água e do Sedimento do Corpo Hídrico p32
1.3.4 Estudos de Monitoramento Biológico p32
1.3.4.1 *Levantamento da População de Peixes* p33
1.3.4.2 *Levantamento da Comunidade de Invertebrados Bentônicos* p33
1.3.4.3 *Análise do Tecido do Peixe* p34
1.3.5 Dados Históricos p34
1.3.6 Definição de Efeitos Ambientais p34
1.3.7 Tamanho do Efeito Crítico (TEC) p36
1.3.8 Passos na Condução e Elaboração do Relatório de Estudo de Monitoramento de Efeitos Ambientais p36

1.4 **Peculiaridades do Guia EEM da Environment Canada** p37

1.4.1 Magnitude e Extensão Geográfica dos Efeitos p37
1.4.2 Investigação da Causa do Efeito Ambiental p37
1.4.3 Frequência das Análises p39
1.4.4 Processo de Decisão para o Programa de Monitoramento de Efeitos Ambientais no Canadá (EEM) p39
1.4.5 Nível de Esforço para Investigação dos Efeitos p39
1.4.5.1 *Efeitos Confirmados de Magnitude Maior ou Igual ao TEC* p39
1.4.5.2 *Efeitos Confirmados com Magnitude Inferior ao TEC* p40

1.1 Por que um Guia de Monitoramento Ambiental?

Em se tratando do país com 15% da água doce mundial, com bacias hidrográficas presentes nas mais variadas condições climáticas e ambientais, o conhecimento sobre a qualidade das águas brasileiras, apesar de um desafio, é condição primordial para avaliar a eficácia das diferentes regulações existentes quanto ao controle do lançamento de efluentes industriais e domésticos, para obter efetividade na gestão sustentável dos recursos hídricos e, assim, assegurar seus usos múltiplos de forma perene. O Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das Águas (PNQA) estabelece em seus objetivos a padronização, avaliação e divulgação, de maneira sistemática, das informações dos dados de qualidade de água de forma a torná-los comparáveis entre estados e regiões hidrográficas brasileiras. No entanto, as informações que atualmente subsidiam o panorama da qualidade das águas superficiais no Brasil ainda são desarticuladas e necessitam ser aperfeiçoadas não somente sob a ótica da distribuição e frequência amostrais, mas também quanto à uniformização dos parâmetros analisados (ANA, 2015). Além destas dificuldades sinalizadas no site do PNQA, observa-se também que a avaliação da qualidade das águas está baseada em análises físico-químicas não levam em consideração os efeitos dessas condições nas comunidades biológicas. Considera-se que o monitoramento físico e químico aborda o tipo e a intensidade dos fatores que impactam o ambiente. Quando conjugado ao monitoramento biológico, o resultado é acrescido de informações sobre os efeitos estressores no sistema biológico que pode dizer mais sobre a qualidade e quantidade do distúrbio. A lógica dessa abordagem baseia-se na resposta dos organismos em relação ao meio onde vivem (BUSS; OLIVEIRA; BAPTISTA, 2008).

No que diz respeito à legislação, há diversas regulamentações federais que preveem o uso do monitoramento ambiental sob diferentes enfoques. Por exemplo, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 274 de 2000 (CONAMA, 2000) estabelece

padrões de qualidade para a balneabilidade; a Portaria nº 2.914 de 2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011) do Ministério da Saúde define padrões de potabilidade da água; a Resolução Conama nº 357 de 2005 (CONAMA, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e estabelece diretrizes para seu enquadramento, e a Resolução Conama nº 430 de 2011 (CONAMA, 2011) estabelece limites e parâmetros de monitoramento para lançamento de efluentes. Entretanto, nenhuma delas faz menção quanto à padronização de métodos a serem utilizados pelos órgãos de controle ambiental e nem priorizam o estudo dos efeitos nas comunidades biológicas atingidas.

No que tange à importância da integração dos aspectos físicos, químicos e biológicos para a avaliação dos ambientes, a Resolução Conama nº 357 de 2005 (CONAMA, 2005) estabelece que a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, utilizando organismos ou comunidades aquáticas, o que aproxima os dispositivos legais à proposta aqui apresentada, mas não define diretrizes de quais métodos biológicos devem ser minimamente avaliados, mesmo por que a simples presença de organismos não é indicativo de sucesso de uma espécie, mas sim as condições populacionais e a sua eficiência reprodutiva, que são medidas pelo tamanho populacional, qualidade de vida dos indivíduos e tempo de permanência dessas condições a partir da identificação da sucessão de gerações.

No Canadá e na Inglaterra, para a avaliação e classificação da qualidade de corpos hídricos, as agências ambientais federais levam em consideração os parâmetros físicos, químicos e biológicos (DIRECTIVE 2000/60/EC; ENVIRONMENT CANADA, 2010 e 2012).

1.2 Projeto Peixe Guia

O Projeto Peixe Guia teve como objetivo a introdução de um método de avaliação ambiental integrado, propondo uniformização e a padronização dos tipos de análises a serem realizadas, permitindo assim a comparação da saúde entre os recursos hídricos e a avaliação da eficácia dos diferentes instrumentos da Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) da Agência Nacional de Águas (ANA).

Para tanto, o desenvolvimento do modelo foi baseado na experiência canadense de sucesso, o Environmental Effects Monitoring (EEM), desenvolvido e consolidado pela Environment Canada (Agência Ambiental Canadense) e pelo Canadian Rivers Institute (CRI). O EEM é uma ferramenta padronizada de medição de desempenho, que avalia a adequação dos limites de descarga de resíduos especificados nos regulamentos,

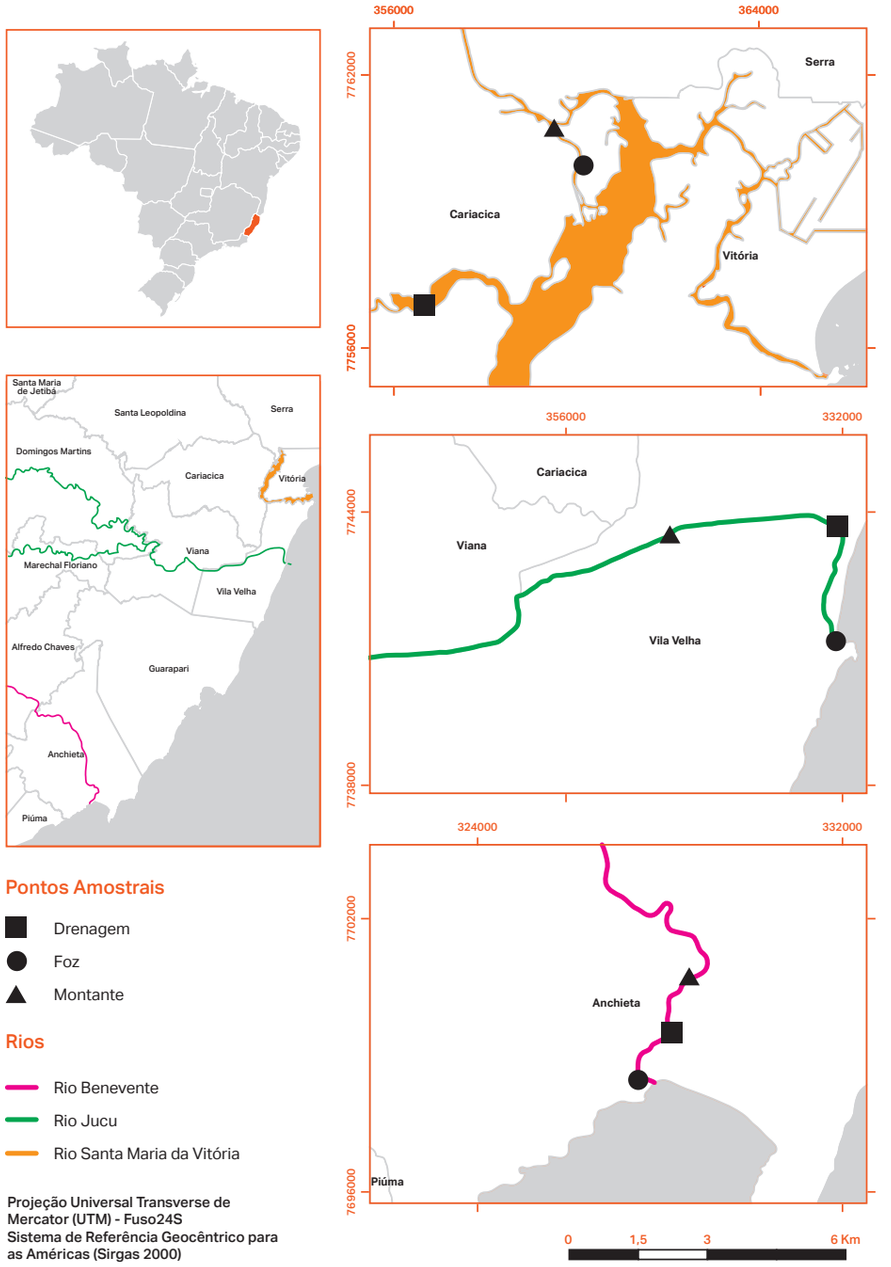


Figura 1.1 Mapa com localização dos pontos amostrais do Projeto Peixe Guia realizado nos rios Benevente, Jucu e Santa Maria da Vitória – Brasil.

visando proteger a grande variedade de ambientes hídricos receptores (ENVIRONMENT CANADA, 2005, 2010, 2012). O EEM vai além da simples medição de químicos nos efluentes, tradicionalmente solicitados nas normatizações, aliando também análises físicas, biológicas e ecotoxicológicas nos ecossistemas aquáticos. Essas análises permitem avaliar a qualidade das regulações de proteção dos corpos hídricos e também as estratégias de intervenção a tempo de garantirem a boa qualidade do *habitat*, que, por sua vez, viabilizam a permanência e a qualidade das populações significativas de peixes, importantes para a sustentabilidade das atividades pesqueiras.

O programa EEM começou a ser desenvolvido no início dos anos de 1990 em resposta à preocupação com a proteção e a preservação dos corpos hídricos e com a falta de um programa único de monitoramento com resultados consistentes que permitissem avaliar se os parâmetros regulatórios seriam suficientes para garantir a proteção desses ambientes. Após debates sobre o custo, utilidade, relevância e interpretação do programa, o EEM foi instaurado no Canadá em 1992 como um programa de monitoramento cíclico financiado pela indústria/órgão que está lançando o efluente, fornecendo informações (públicas) sobre a saúde de peixes e bentos nos corpos hídricos receptores (MUNKITTRICK *et al.*, 2005).

Completando 23 anos de existência, o EEM já avaliou diversas indústrias (celulose e papel, mineração) no Canadá e está sendo usado como modelo de Monitoramento de Efeitos Ambientais (MEA) em vários países, como Chile (CHIANG *et al.*, 2010; CHIANG *et al.*, 2011), Sri Lanca (SUMITH; MUNKITTRICK, 2011), Nova Zelândia (HEUVEL *et al.*, 2006), Uruguai e Argentina (ECOMETRIX, 2006), Austrália (KEOUGH; MAPSTONE, 1997), Suécia (SVANBERG; BENGTSSON, 1996; SERVOS *et al.*, 1996), EUA (HALL; LANDIS, 2009; HALL *et al.*, 2009). O EEM é um dos mais antigos modelos de programa de MEA, que funciona num acordo entre indústria/órgão e agência ambiental, fornecendo grande quantidade de resultados que comprovam sua eficiência e eficácia. Atualmente o EEM é um programa referência de monitoramento[1], com metodologias padronizadas que comprovadamente medem o impacto no ambiente avaliado ao longo do tempo e que estão disponíveis para o uso não só das indústrias, mas também das instituições públicas, privadas e órgãos ambientais.

A aplicabilidade e adaptação do modelo canadense à realidade brasileira foi realizada em um estudo piloto, ocorrido entre dezembro de 2013 e dezembro de 2015, em três áreas localizadas ao longo de um gradiente

1 http://www.ec.gc.ca/can-chil/default.asp?lang=En&n= B0D4D0F8-1

Figura 1.2 Foto do Rio Jucu – ES em período de chuva, dezembro de 2013.

Figura 1.3 Foto do estuário do Rio Santa Maria da Vitória – ES.

Figura 1.4 Pesquisadores da Universidade de New Brunswick e da Environment Canada, orientadores do Projeto Peixe Guia. Na foto, da esquerda para direita: Dra. Paulina Bahamonde, Dr. Ervin Mark McMaster, Dra. Joanne Parrott e Dr. Mark Hewitt conhecendo informações sobre os estuários capixabas.

Figura 1.5 Apresentação do Dr. Mark McMaster sobre o Modelo de Monitoramento de Efeitos Ambientais da Environment Canada em Vitória – ES. Dezembro de 2013.

de concentração de contaminantes nos estuários dos rios Benevente, Jucu e Santa Maria da Vitória, no Espírito Santo (Figuras 1.1 a 1.3). O projeto foi concebido sob o formato de redes cooperativas envolvendo instituições internacionais e nacionais, ligadas às áreas de pesquisa, regulação e atuação junto à sociedade civil, de forma a envolver, em todas as fases do projeto, os atores que serão responsáveis pela implementação do método, inclusive os fóruns democráticos de gestão dos recursos hídricos. O Projeto contou com a orientação técnica de pesquisadores canadenses da Environment Canada e do CRI (Figuras 1.4 a 1.7).

Os resultados deste estudo piloto encontram-se em artigos científicos que serão publicados em 2016. A etapa final do Projeto Peixe Guia, incluiu a elaboração deste Guia de Monitoramento Ambiental de Recursos Hídricos, de caráter público, e que poderá ser prontamente utilizado tanto no Estado do Espírito Santo quanto em outros estados do Brasil.

Com a aplicação deste Guia espera-se: ① fornecer aos gestores um instrumento prático para enquadramento e monitoramento de recursos hídricos, ② maximizar a efetividade dos estudos de avaliação e monitoramento ambiental, ③ otimizar o tempo e os custos dos mesmos, ④ avaliar a efetividade das regulações para o controle de lançamento dos efluentes industriais e domésticos, ⑤ auxiliar na definição de áreas prioritárias e na elaboração de seus planos de recuperação, ⑥ avaliar a efetividade das ações definidas nos planos de bacia, tendo como base as metas progressivas e finais de enquadramento fixadas em cada trecho dos corpos d'água, ⑦ responder futuros questionamentos sobre a saúde das comunidades de peixes da região, e ⑧ fortalecer relacionamento e confiança com a sociedade, já que utiliza espécies bioindicadoras perceptíveis pela comunidade, coletadas no próprio recurso hídrico, como o peixe.

1.3 Descrição do Guia Técnico de Monitoramento de Efeitos Ambientais em Recursos Hídricos (MEA)

O guia de MEA foi desenhado para detectar e medir mudanças do ecossistema aquático, apresentando etapas de investigação ambiental que são usadas para determinar a efetividade do controle ambiental, através da avaliação dos efeitos de efluentes nos peixes, no *habitat* dos peixes e no uso dos recursos pesqueiros. O MEA vai além da medição de químicos no efluente e no corpo hídrico: examina a efetividade das medidas de proteção ambiental diretamente nos seres vivos dos ecossistemas aquáticos. Efeitos de longo prazo são avaliados a partir de monitoramentos regulares e contínuos para investigar

Figura 1.6 Apresentação do Dr. Mark Hewitt sobre os parâmetros importantes para avaliar a saúde dos peixes, segundo Modelo de Monitoramento Ambiental da Environment Canada. Dezembro de 2013.

Figura 1.7 Aula prática, liderada pela pesquisadora Dra. Joanne Parrott da Environment Canada, para avaliação da saúde dos peixes no laboratório da UVV. Participação de profissionais da APLYSIA, Cesan, Semmam e UVV. Dezembro de 2013.

os impactos sobre os parâmetros escolhidos e em diferentes localidades (caracterização espacial e temporal). O guia de MEA consiste basicamente de: monitoramento da qualidade química do efluente, da água e do sedimento; da avaliação da toxicidade crônica; e de estudos de monitoramento biológico no ecossistema aquático receptor para determinar se estão sendo causados efeitos aos peixes, ao *habitat* dos peixes e aos recursos pesqueiros.

1.3.1 Caracterização do Efluente

A caracterização do efluente é conduzida pela análise química de uma amostra e registro de parâmetros básicos como pH, dureza, condutividade, alcalinidade, sólidos suspensos totais, e também as concentrações de contaminantes típicos. Por exemplo, efluentes de mineração deverão ser avaliados quanto a concentração de: alumínio, cádmio, ferro, molibdênio, selênio, amônia, nitrato, fosfato (ENVIRONMENT CANADA, 2012). Vale ressaltar que a medição química envolve substâncias já reguladas e não é necessária uma avaliação exaustiva. Investigações mais profundas, com parâmetros não convencionais, poderão ser realizadas, desde que algum efeito tenha sido observado nos peixes ou na comunidade bentônica coletada no corpo hídrico receptor.

1.3.2 Avaliação de Toxicidade Crônica

Avaliação da toxicidade crônica é conduzida no efluente que está sendo descartado no ambiente aquático para avaliar o potencial de causar efeitos biológicos. Os ensaios deverão incluir medidas de sobrevivência, crescimento ou reprodução e deverão ser realizados com organismos típicos de água doce ou marinha dependendo do local onde o efluente está sendo lançado. Ensaios envolvendo peixes, espécies de invertebrados e algas são indicados. A análise somente dos efeitos tóxicos do efluente não garante que efeitos não ocorram na biota do corpo hídrico receptor. Walker, Lowell e Sherry (2005) observaram que os ensaios crônicos do efluente de plantas de celulose no Canadá foram muito eficientes em avaliar melhorias das Estações de Tratamento de Efluente (ETES) e mudanças no processo produtivo, mas estes ensaios não predisseram os efeitos observados nos peixes coletados no corpo hídrico.

Os ensaios de ecotoxicidade são uma ferramenta efetiva para rastrear a qualidade do efluente, mas diferentes características do corpo hídrico receptor irão determinar se os impactos acontecerão na natureza.

1.3.3 Monitoramento da Qualidade da Água e do Sedimento do Corpo Hídrico

Amostras para monitoramento da qualidade da água devem ser coletadas a partir do ponto de lançamento do efluente e de regiões sob influência do mesmo e também em áreas consideradas referência. A temperatura da água e as concentrações de oxigênio dissolvido deverão ser registradas em todas as amostragens. Assim como para a caracterização do efluente, a concentração de compostos típicos do efluente deverão ser avaliados na água. Quando o efluente é despejado em águas continentais o pH, dureza, condutividade e alcalinidade deverão ser registrados. No caso em que o efluente é lançado em águas marinhas, a salinidade também deverá ser registrada. A concentração de alguns tipos de substâncias deletérias deverá ser registrada usando bibliografias e a legislação vigente no Brasil para definição dos mesmos.

Como complemento do levantamento da comunidade de invertebrados bentônicos, amostras de sedimento deverão ser coletadas nos mesmos pontos que as amostras de bentos para análise da contaminação química, do conteúdo de carbono orgânico total (COT) e da granulometria. As análises químicas também indicam se o efluente está alcançando os pontos amostrais (análise da água) e fornecem histórico aproximado da contaminação (sedimento).

1.3.4 Estudos de Monitoramento Biológico

Para avaliar os efeitos biológicos, estudos são conduzidos a partir de três componentes: avaliação dos efeitos da população de peixes existentes, avaliação no *habitat* dos peixes (avaliação da comunidade de invertebrados bentônicas) e avaliação da concentração de contaminantes no tecido do peixe para fins de consumo humano e indicação da residência e exposição dos animais ao efluente.

Para investigar os efeitos biológicos, estudos são conduzidos com os objetivos de avaliar a magnitude e a extensão geográfica dos efeitos e de determinar a causa dos efeitos.

Os estudos serão conduzidos tanto na área de exposição ao efluente quanto nas áreas referência. A área referência servirá de modelo de dados para a qualidade da água sem o lançamento do efluente, para o *habitat* do peixe e também para a qualidade do peixe nela encontrado.

1.3.4.1 Levantamento da População de Peixes

O levantamento da população de peixes mede a saúde dessa população na região próxima ao lançamento de dejetos e em áreas referência ou ao longo de gradiente de concentração para determinar se o efluente tem algum efeito nos peixes (Tabela 1.1). No Canadá, um levantamento de peixe é requerido se a concentração do efluente dentro do rio é maior que 1% na distância de 250 metros do ponto final de descarga (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

O levantamento da população de peixes deve avaliar o crescimento, a reprodução, o índice de condição e a sobrevivência. A coleta de machos e fêmeas adultas de duas espécies sentinelas é recomendado. Os dados coletados na região de lançamento dos efluentes são avaliados quanto a existência de diferenças estatísticas em relação aos encontrados na área referência.

Tabela 1.1 Indicadores de efeitos e *endpoints* avaliados no levantamento da população de peixes.

Indicador de Efeito	Endpoints
Crescimento (uso da energia)	Peso corporal relativo a idade
Reprodução (uso da energia)	Peso da gônada / peso corporal
Índice de Condição (estoque de energia)	Peso corporal / comprimento e Peso fígado / peso corporal
Sobrevivência	Idade média

O guia EEM (ENVIRONMENT CANADA, 2012) menciona que apesar de recomendarem um estudo básico de levantamento de peixes, outros desenhos amostrais, outros métodos de avaliação não letal de peixes ou métodos alternativos podem ser considerados em condições onde o método básico padrão não é efetivo ou prático. Gray, Curry e Munkittrick (2002) fornecem informações de avaliações não letais de peixes. Palace *et al.* (2005) e Orrego *et al.* (2006), por exemplo, propõem o uso de pequenos peixes engaiolados e expostos ao efluente em campo quando torna-se difícil a coleta; vale alertar que o crescimento e as respostas reprodutivas podem ser impactados.

1.3.4.2 Levantamento da Comunidade de Invertebrados Bentônicos

Os estudos da comunidade de invertebrados bentônicos são realizados para avaliar se dejetos estão afetando o *habitat* dos peixes. Os bentos são coletados para determinar se há diferença entre os resultados encontrados na área referência e na área onde ocorre o lançamento de efluente ou áreas dentro

do gradiente de concentração do efluente. Os indicadores (Tabela 1.2) calculados a partir dos dados coletados são avaliados para determinar se há diferença estatística significativa entre os pontos.

Tabela 1.2 Indicadores de efeito e *endpoints* para levantamento da comunidade de invertebrados bentônicos.

Indicador de Efeito	Endpoints
Densidade total	Número de organismos / área
Índice de equitabilidade	Equitabilidade de Simpson's
Taxa de riqueza	Número de taxa
Índice de diversidade	Índice de Bray-Curtis

Se o desenho amostral não for efetivo ou prático, um levantamento alternativo poderá ser apropriado.

1.3.4.3 Análise do Tecido do Peixe

A análise do tecido do peixe é conduzida para avaliar se contaminantes típicos do efluente e perigosos a saúde humana podem estar presentes em concentrações que afetem o uso dos recursos pesqueiros. Também permite identificar a residência e a exposição dos peixes ao efluente.

1.3.5 Dados Históricos

Estudos pretéritos de monitoramento ambiental que levaram em consideração a população de peixes, análise do tecido dos peixes e estudos da comunidade de invertebrados bentônicos podem ser levados em consideração. Entretanto, se as atividades operacionais do emissor do efluente mudaram ou tenha acontecido algum evento que possa ter modificado os efeitos biológicos após o período previamente monitorado, estes dados devem ser usados e interpretados com cautela.

1.3.6 Definição de Efeitos Ambientais

Um efeito na população de peixe ou na comunidade de invertebrados bentônicos é definido como a diferença estatística entre os dados coletados na área em exposição ao efluente e os dados coletados na área referência ou áreas de amostragem dentro da área de disposição que apresentam concentrações gradualmente decrescentes do efluente com o aumento da distância a partir do ponto de lançamento do efluente. Um efeito no tecido dos peixes se refere ao aumento da concentração de contaminante no tecido de peixe em níveis estatísticos significativamente diferentes daqueles encontrados no tecido de peixe coletado na área referência. Para avaliar se existe diferença estatística significativa entre os pontos amostrais, dados de cada efeito específico são comparados isoladamente.

No Canadá, o EEM sugere que para confirmar se os efeitos observados não são artefatos (ou falsos positivos) os estudos devem ser realizados novamente numa fase subsequente três anos depois. Vale ressaltar que no Brasil um espaçamento de tempo como este ainda não é possível devido à falta de informações cíclicas e padronizadas e também à rapidez nos metabolismos e na dinâmica ambiental típicos de países tropicais e que, geralmente, são superiores às encontradas em países temperados. Além disso, é importante ter uma base consolidada de dados de cada ponto amostral para futuras comparações; o que ajuda a entender a variabilidade natural dos *endpoints* adotados e que estão sendo mensurados, assim como ajuda na definição do tamanho amostral mais apropriado a ser usado no futuro.

Se um efeito do mesmo tipo é encontrado na população de peixe, no tecido do peixe ou na comunidade de invertebrados bentônicos em duas amostragens consecutivas, o efeito é considerado confirmado. Confirmação de um efeito em peixes não necessariamente precisa estar limitado ao mesmo sexo ou a mesma espécie, a não ser que condições específicas do local necessitem de uma abordagem diferente. Se os efeitos são confirmados em um ou mais componentes (população de peixe, tecido de peixe, comunidade de invertebrados bentônicas), o responsável pelo lançamento do efluente precisa investigar esses efeitos em fases subsequentes. Toda confirmação de efeitos tem que ser investigada. Se não forem observados efeitos nos três componentes biológicos do MEA, o lançador do efluente deverá prosseguir com uma frequência de monitoramento biológico reduzida. A atribuição da causa ao efeito encontrado pode ser difícil em algumas circunstâncias. A Agência Ambiental Canadense recomenda que, onde estudos prévios foram realizados, o estudo amostral deverá ser desenhado no sentido de maximizar a confiança em estabelecer a relação causa-efeito. Ajustes no desenho amostral que possam ajudar a eliminar fatores que possam confundir os resultados encontrados poderão ser incluídos no esforço amostral tanto do ponto referência quanto na área sob influência do efluente; inclusive mudança ou aumento das áreas a serem amostradas; ou uso de outras metodologias de estudos, como por exemplo o mesocosmos ou bivalves engaiolados (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

1.3.7 Tamanho do Efeito Crítico (TEC)

Quando há amostras de grande tamanho, pequenas diferenças podem ser estatisticamente significativas. A Agência Ambiental Canadense reconhece que mudanças ecologicamente relevantes podem ser maiores do que as detectadas por desenhos amostrais estatisticamente fortes; assim, eles adotam o TEC para tomada de decisão sobre ajustes no programa de monitoramento ambiental.

O TEC é o limiar acima do qual o efeito pode ser um indicativo de alto risco para o ambiente. A Tabela 1.3 apresenta os limiares estabelecidos pela Agência Ambiental Federal Canadense no programa de Monitoramento de Efeitos Ambientais do setor de mineração (ENVIRONMENT CANADA, 2012). Abordagens adicionais também poderão ser usadas para avaliar o TEC (MUNKITTRICK *et al.*, 2009).

Tabela 1.3 Tamanho do Efeito Crítico (TEC) para avaliação dos efeitos ambientais.

Endpoint Efeito em peixes	TEC[1]	*Endpoint* Efeito nos bentos	TEC[1]
Peso / idade	± 25%	Densidade	± 2 DP
Peso gônada / peso total	± 25%	Equitabilidade de Simpson's	± 2 DP
Peso fígado / peso total	± 25%	Taxa riqueza	± 2 DP
Condição	± 10%	Índice de Bray-Curtis	+ 2 DP
Idade[2]	± 25%		

[1]Diferença nos efeitos da população de peixes são expressos em porcentagem (%) do resultado médio encontrado no ponto referência, enquanto que as diferenças nos efeitos no bentos são expressos em Desvio Padrão da área referência.
[2]Problemas associados a determinação da idade de algumas espécies de peixe podem ser discutidos e revisados antes que os efeitos no item "peso/idade" e "idade" sejam usados para definir o caminho a ser seguido no Monitoramento Ambiental.

1.3.8 Passos na Condução e Elaboração do Relatório de Estudo de Monitoramento de Efeitos Ambientais

O relatório do estudo de MEA deve conter as seguintes etapas: caracterização da zona de mistura do efluente no rio e a medição da concentração de efluente a 250 m do seu lançamento; descrição da área referência e da área de lançamento do efluente, descrição do *habitat*; tipo de processo produtivo e práticas de proteção ambiental do empreendimento; o sumário de leis federais, estaduais e municipais aplicáveis ao lançamento do efluente; descrição de qualquer fator antropogênico ou natural que possa contribuir para algum efeito observado; espécies de peixe selecionadas para serem usadas como indicadoras; áreas de amostragem; tamanho da amostra; período de amostragem; metodologias de campo e de laboratório, e ainda as metodologias para determinação se o efluente tem algum efeito na população de peixe, no tecido do peixe ou na comunidade de invertebrados bentônicas; descrição do controle de qualidade das análises usadas para garantir a validade dos dados; resultados da caracterização do efluente, ensaios ecotoxicológicos, monitoramento da qualidade da água e sedimento, estudo de monitoramento biológico; e avaliação e interpretação dos resultados.

1.4 Peculiaridades do Guia EEM da Environment Canada

1.4.1 Magnitude e Extensão Geográfica dos Efeitos

Segundo o Guia EEM da Environment Canada (2012), quando os resultados de dois estudos sucessivos de monitoramento biológico indicam um tipo de efeito (acima de TEC) similar na população do peixe, no tecido do peixe ou na comunidade bentônica, uma avaliação da magnitude e extensão geográfica é importante. A magnitude e extensão geográfica deverá ser avaliada para todos os efeitos confirmados. Este estudo poderá requerer esforços de monitoramento adicionais, como aumento de pontos amostrais a jusante e espécies adicionais para determinar quanto e quão consistente os efeitos são. Informações necessárias podem já existir e serem utilizadas como apoio.

1.4.2 Investigação da Causa do Efeito Ambiental

No Canadá, se os resultados do monitoramento biológico indicarem a extensão e a magnitude do efeito na população de peixes, no tecido do peixe ou na comunidade de invertebrados bentônica, um estudo de investigação da causa do efeito é requerido (ENVIROMENT CANADA, 2012). A intensidade do esforço amostral deve ser proporcional ao tamanho da preocupação e várias abordagens já foram discutidas anteriormente (HEWITT *et al.*, 2005). Nestes estudos, as indústrias podem atender aos requerimentos da Environment Canada investigando as causas, apresentando soluções e dirigindo recursos para projetos que resolverão o problema ambiental do setor como um todo (HEWITT *et al.*, 2008; MARTEL *et al.*, 2011). Os estudos mais recentes têm demonstrado se as medidas mitigadoras foram realmente adotas pelas indústrias e se têm reduzido os efeitos ambientais.

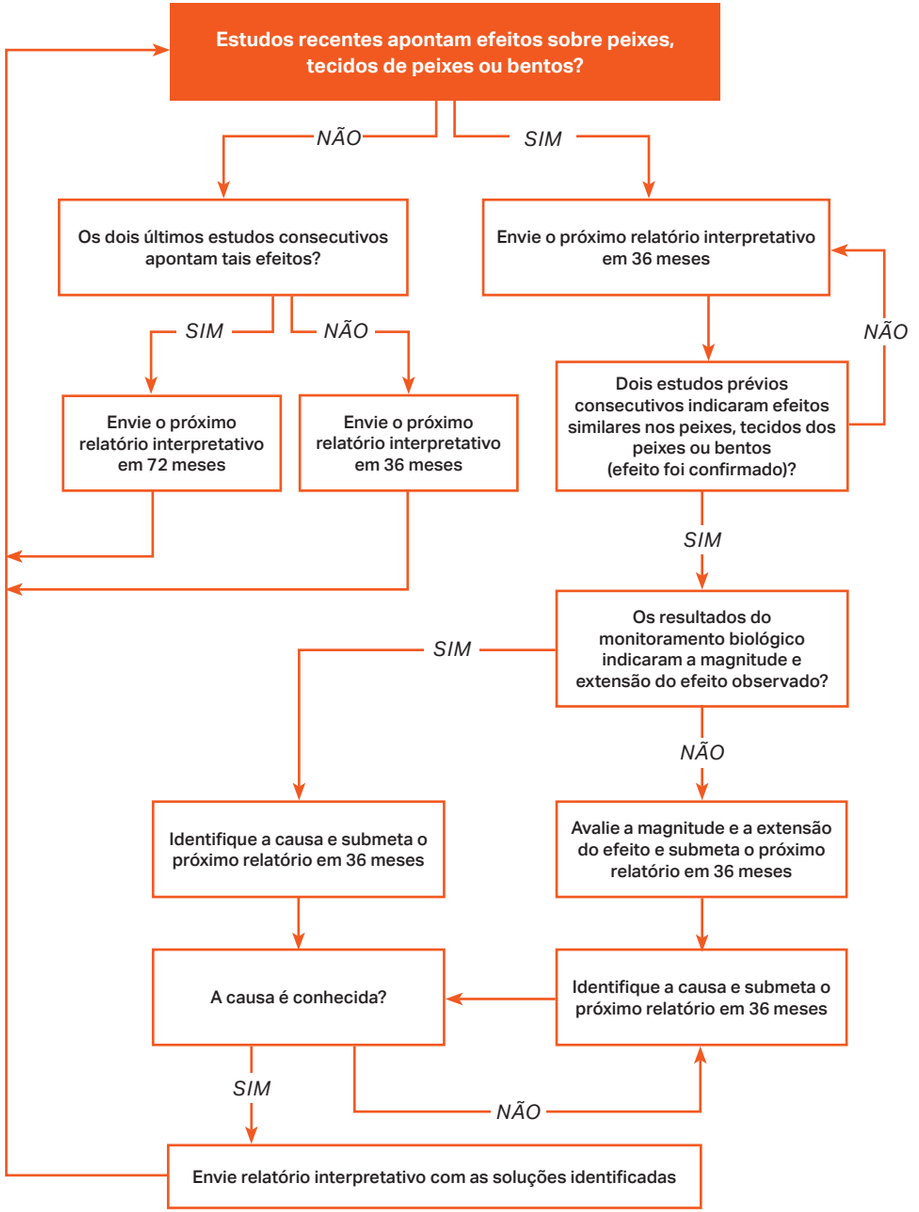


Figura 1.8 Diagrama de decisão para auxiliar a identificação de um caminho apropriado dentro do programa de EEM (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

1.4.3 Frequência das Análises

No Canadá, a caracterização do efluente é conduzida quatro vezes por ano, os ensaios de toxicidade crônicos são conduzidos duas vezes por ano e por três anos consecutivos. O monitoramento da qualidade da água é conduzido quatro vezes ao ano de acordo com as mudanças sazonais associadas a diluição que é dependente do período de chuva. A coleta da água e do sedimento deverá ocorrer ao mesmo tempo que os estudos de monitoramento biológico. Um relatório anual com os estudos da qualidade da água e do efluente deverão ser enviados para agência ambiental (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

1.4.4 Processo de Decisão para o Programa de Monitoramento de Efeitos Ambientais no Canadá (EEM)

A Figura 1.8 apresenta um diagrama de decisão para auxiliar a identificação de um caminho apropriado dentro do programa de EEM baseado na sua respectiva situação. A estrutura da árvore de decisão é baseada nos requisitos regulatórios do EEM no conhecimento científico atual, na experiência e no conhecimento adquirido na implementação do programa EEM do Canadá. O conhecimento do local, bem como do efluente e da qualidade da água, é requisito para identificar o caminho a ser seguido dentro do programa canadense. As empresas são requisitadas a continuarem o monitoramento do efluente e da qualidade da água no corpo hídrico, e a enviarem relatórios de resultados independentemente dos estudos biológicos do programa EEM.

1.4.5 Nível de Esforço para Investigação dos Efeitos

O empreendedor é requerido a investigar todos os efeitos confirmados. Os próximos parágrafos fornecem recomendações de como os efeitos confirmados deverão ser investigados dependendo da magnitude.

1.4.5.1 Efeitos Confirmados de Magnitude Maior ou Igual ao TEC

O empreendedor com efeitos confirmados de magnitude superior ou igual ao TEC deverá conduzir um estudo de campo para avaliar a magnitude "extensão geográfica dos efeitos" e submeter um relatório interpretativo em 36 meses. Subsequentemente, deverá conduzir estudos

em campo e/ou laboratório para determinar a causa dos efeitos e submeter um relatório interpretativo entre 10 e 36 meses. Se a magnitude "extensão geográfica do efeito" já foi determinada, o empreendedor deve mover diretamente para determinar a causa dos efeitos.

1.4.5.2 Efeitos Confirmados com Magnitude Inferior ao TEC

Se o efeito confirmado tiver magnitude inferior ao TEC, o empreendedor poderá avaliar a extensão e a magnitude geográfica.

2 Revisão dos efeitos ambientais causados pela poluição industrial, doméstica e agrícola

Priscylla da Mata Pavione
Vinícius Dadalto Baroni
Tatiana Heid Furley
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick

2.1 Considerações Gerais p47

2.2 Efeitos Biológicos: Indicadores a Qualidade Ambiental p48

2.2.1 Efeitos em Peixes p48

2.2.2 Efeitos na Comunidade de Invertebrados Bentônicos p55

2.1 Considerações Gerais

A posição privilegiada do Brasil em relação aos outros países quanto ao seu volume de águas continentais deu suporte ao comportamento de desperdício dos recursos hídricos e a não realização de planejamento e proteção do recurso (LIMA, 2000).

O desenvolvimento acelerado da área urbana e industrialização no começo do século XX produziu a competição pelos recursos naturais causando alguns impactos socioambientais. Para evitar algumas doenças causadas pela falta de saneamento foi criado o plano de abastecimento de reservatórios de águas sem contaminação e a coleta de esgoto com despejo a jusante. Entretanto a água era despejada sem tratamento, fase chamada de higienista (TUCCI, 2008).

As maiores fontes poluidoras nos centros urbanos são os efluentes industriais e os domésticos com e sem tratamento (Figura 2.1). Algumas ou senão a maior parte das áreas urbanizadas do Brasil despejam efluentes sem tratamento nos recursos hídricos, assim os núcleos urbanos a jusante serão prejudicados (ARCHELA *et al.*, 2003).

Além do crescimento desenfreado nas áreas urbanas e da exploração dos recursos naturais, o século XX foi também marcado pela chamada "revolução verde", modelo de produção agropecuária baseado no uso de fertilizantes e melhoramento genético de plantas. Entretanto, este modelo tinha pouca preocupação em relação ao uso de agrotóxicos e à contaminação do solo e da água (GOMES; BARIZON, 2014) e até mesmo dos organismos vivos.

Apesar de os estudos mostrarem que o uso do agrotóxico pode comprometer o sistema aquático, o Brasil ainda é líder mundial de uso de agrotóxicos; os mesmos foram criados para o controle de pragas e organismos patogênicos que pudessem comprometer a produção agrícola (GOMES; BARIZON, 2014).

O uso de agrotóxicos aplicado no solo e/ou nas plantas se desloca principalmente para as águas superficiais e subterrâneas, sendo dissipado e podendo gerar novos produtos a partir da degradação ou mineralização das

moléculas (GOMES; BARIZON, 2014). Nos anos de 2001 e 2008 o Brasil saiu de US$ 2 bilhões para um pouco mais de US$ 7 bilhões, assumindo a posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, foram 986,5 mil toneladas de aplicados. Em 2009, o consumo passou de 1 milhão de toneladas, representando cerca de 5,2 kg de agrotóxico por habitante (LONDRES, 2011).

Estudos têm mostrado que alguns produtos agroquímicos estão sendo detectados na superfície da água e causando efeitos nos organismos e ecossistemas. A contaminação da água e do solo provoca variações nos organismos não alvo, podendo causar um desequilíbrio no ambiente, favorecendo o aparecimento de novas pragas ou contaminando rios, açudes e lagos (CHAIM, 2004).

2.2 Efeitos Biológicos: Indicadores a Qualidade Ambiental

A qualidade da água nos ecossistemas aquáticos é de grande importância para utilização de recursos domésticos, agrícolas, industriais e para a preservação da biota (ADAMS, 2002). O monitoramento da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos permite detectar flutuações de suas características naturais e verificar se alterações na biota estão ocorrendo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Para o monitoramento de efeitos ambientais no ecossistema aquático, têm sido desenvolvidas metodologias tanto *in situ* quanto bioensaios laboratoriais que utilizam bioindicadores, tais como anfípodos bentônicos e peixes.

2.2.1 Efeitos em Peixes

Os programas de monitoramento ambiental aquático têm utilizado vertebrados aquáticos, no caso os peixes, como bioindicadores para avaliação da qualidade de água. O uso dos peixes em monitoramentos vem crescendo nos últimos tempos (ADAMS, 2002) pelo fato de ser um dos grupos mais diversificados de vertebrados, com mais de 25.000 espécies ocupando a maior parte dos nichos aquáticos (BOLS *et al.*, 2001), e por estarem em geral no topo da cadeia (ADAMS, 2002).

Estudos vêm mostrando a sua sensibilidade como bioindicadores (BOLOGNESI *et al.*, 2006) por possuírem respostas às alterações ambientais relativamente mais rápidas do que a dos mamíferos (BOLS *et al.*, 2001) uma vez que algumas espécies são capazes de metabolizar contaminantes orgânicos assimilando o produto desse processo ao material genético e outras moléculas importantes (BOLOGNESI *et al.*, 2006).

Figura 2.1 Cais da comunidade da Ilha das Caieiras, Vitória – ES.

Os peixes são sensíveis a vários fatores estressores ambientais que incluem as condições físicas e químicas da água e sedimentos, tais como, o oxigênio dissolvido, temperatura, pH, nutrientes, amônia, salinidade, dureza, metais pesados, pesticidas, PCB e fenóis. Os fatores de estresse biológico podem ser causados por parasitas, vírus e agentes patogênicos (Figura 2.2) (RUDNEVA, 2014).

A resposta tóxica varia entre espécies e sexo. Em algumas espécies os machos biotransformam compostos mais rapidamente que as fêmeas devido às diferenças metabólicas da atividade hormonal. A retenção e assimilação do contaminante pelo organismo pode acarretar a concentração elevada do mesmo, aumentando a probabilidade de efeitos deletérios (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). O peso do corpo da fêmea é geralmente menor do que do macho, pois as mesmas produzem produtos químicos lipofílicos para o desenvolvimento dos ovos e podem liberar mais de 20% do seu peso corporal quando desovam (LARSSON; ORLA; COLVIN, 1993).

Estudos de campo e bioensaios em laboratório feitos no mundo todo tem avaliado os efeitos dos efluentes tratados e não tratados das fábricas de celulose (DAY; CHOUDHURY; DAS, 2013), indústrias farmacêuticas, agrotóxicos e efluentes domésticos em peixes. Alguns estudos, tais como têm sido realizados no Canadá, no Chile e em outros países focam nos feitos a níveis populacionais (BOWRON *et al.*, 2009; CHIANG *et al.*, 2014), em termos

de toxicidade aguda e comportamental, desenvolvimento, crescimento, reprodução e desregulação endócrina, imunotoxicidade, hematotoxicidade, genotoxicidade, histotoxicidade (DAY; CHOUDHURY; DAS, 2013).

Os efluentes podem prejudicar os peixes causando aumento da mortalidade ou interferindo nos recursos de absorção de nutrientes e alimentação, reduzindo suas taxas de crescimento e reprodução. Quando menos energia está disponível para a reprodução, menor é a abundância e a riqueza de espécies. O crescimento e a reprodução, portanto podem servir como indicadores da qualidade ambiental. O alto fator de condição reflete a boa qualidade do ambiente; enquanto um baixo fator de condição reflete a má qualidade ambiental. O índice hepatossomático (IHS) fornece a indicação sobre o estado de reserva de energia do organismo através da avaliação do fígado (Figura 2.3). Tem sido relatado que em um ambiente pobre e com concentrações elevadas de cádmio e zinco os peixes costumam ter fígado menor (com menos energia reservada). O índice gonadossomático (IGS) é usado para estimar a condição reprodutiva através da avaliação da gônada (Figura 2.4), que é a fase mais crítica no ciclo de vida de uma espécie (ENVIRONMENTAL PROTECTION DEPARTMENT, 2005).

Sadekarpawar e Parikh (2013) avaliaram as respostas de *Oreochromis mossambicus* expostos a micronutrientes (250 mg L^{-1} e 5000 mg L^{-1}) usados como fertilizantes durante o tempo de 45 dias. Foram observados valores baixos nos índices de IHS e IGS nos organismos expostos, as alterações foram acompanhadas por alterações histopatológicas no fígado, ovário, bem como em testículo.

No Chile, os estudos perto das indústrias de celulose e papel têm mostrado menor riqueza de espécies de peixes e aumento na abundância de espécies nativas (CHIANG *et al.*, 2010). O declínio de espécies endêmicas pode estar relacionado com a falta de recursos alimentares para eles e predação. Estudos feitos em Bacias Hidrográficas do Norte (Canadá) corroboraram com os dados encontrados por Chiang *et al.* (2010), nas áreas expostas aos efluentes de esgoto e celulose os peixes responderam, mostrando sinais de crescimento e desenvolvimento em relação a montante, mas foram encontradas evidencias de desregulação endócrina e alterações na saúde dos peixes, provocando a perda potencial de reprodução e possivelmente o declínio da população (MCMASTER *et al.*, 2005).

Pathan, Sonawane e Khillare (2009), avaliaram a concentração letal de 50% de mortalidade de *Rasbora daniconius* exposto ao efluente de uma fábrica de celulose utilizando método de biensaio laboratorial, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Em todos tempos exposição foi observado efeito quanto a natação errática, movimento espasmódico, movimento opercular rápido e efeito na mucosa da superfície do corpo grossa.

Chiang *et al.* (2011) estudou duas espécies de peixes nativos do Chile (*Areolatus tricomycterus* e *Percilia gillissi*) em relação à descarga de efluente de fábrica de celulose; foram observadas respostas diferentes entre as espécies e entre os sexos. Observou-se, por exemplo, aumento na produção gonadal de 17β-estradiol nas fêmeas das duas espécies, corroborando com o resultado encontrado do IGS, especialmente durante o período de verão. Mundialmente, a principal resposta em locais a jusante da descarga de fábricas de celulose tem sido redução no tamanho das gônadas, como visto no Canadá e em outros países, redução da capacidade de produção de esteróides do peixe. Já nos machos foi observado queda na produção da 11-ketotestosterone de *Percilia gillissi.* Foi encontrado ainda que, em ambas as espécies, o tamanho corporal era menor no ponto jusante do local de lançamento de efluente.

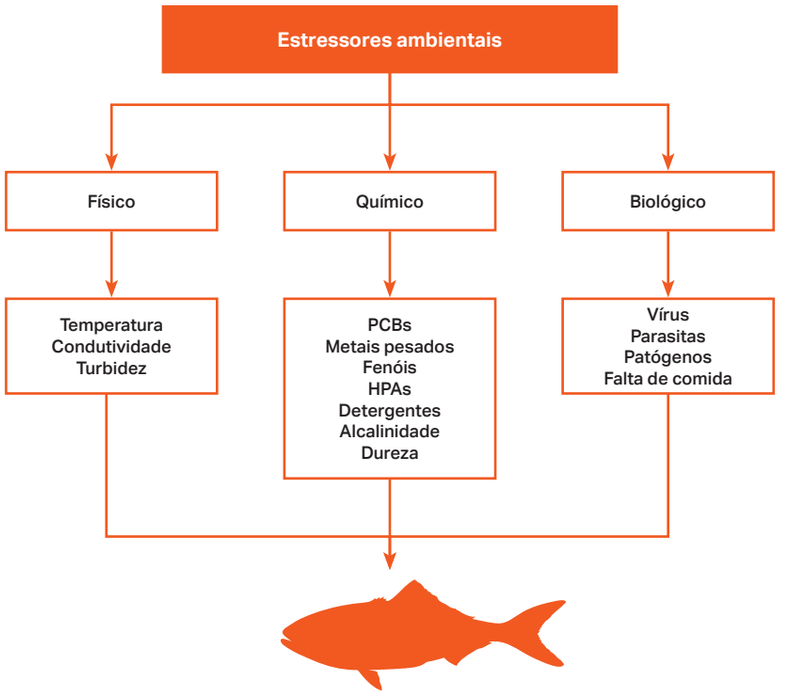


Figura 2.2 Grupos estressores em ambientes aquáticos, baseado no modelo de Rudneva (2014).

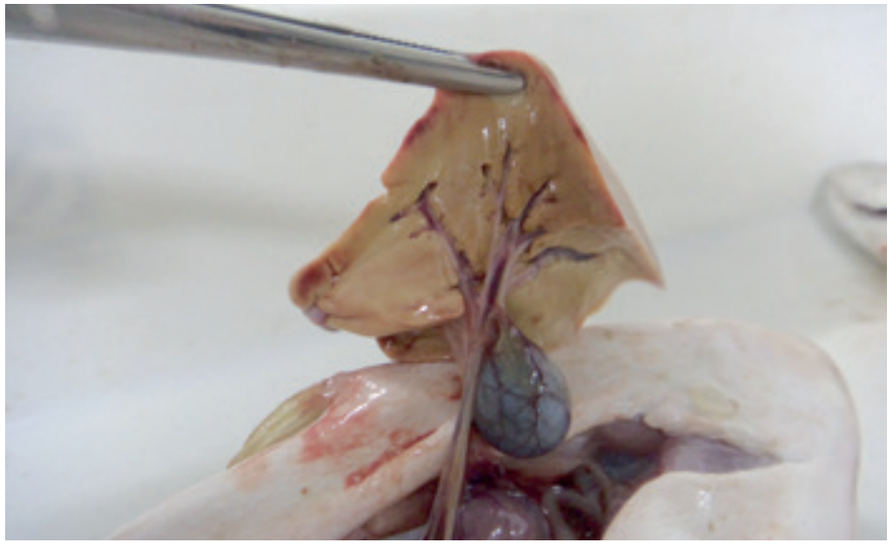


Figura 2.3 Fígado de *Sphoeroides testudineus* (baiacu).

Figura 2.4 Gonâda de *Ophioscion punctatissimus*, uma das espécies utilizadas como bioindicadoras no Projeto Peixe Guia.

Os peixes possuem como principal mecanismo de eliminação de agentes químicos a biotransformação, que leva à formação de compostos hidrofílicos, os quais são excretados mais facilmente que o composto original. O fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), mas também existem outros órgãos desintoxicantes como os rins, intestino e brânquias (COPKIN; ALTINOK, 2013; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Efluentes provenientes das indústrias farmacêuticas, e até mesmo os domésticos, geram descargas de águas residuais de diferentes características e concentrações de contaminantes; dependendo do processo de produção e da área, os produtos químicos mais encontrados nesses efluentes são solventes, detergentes, desinfetantes e químicos farmacêuticos. Reyes *et al.* (2015) avaliou o efeito do efluente proveniente de um medicamento não esteróide anti-inflamatório no *Cyprinus carpio* (carpa comum). Indivíduos foram expostos ao menor nível de efeito adverso observado (0,1173%) nos tempos de 12, 24, 48, 72 e 96h. Foi observado aumento das respostas genotóxicas (ensaio cometa e teste micronúcleo) e citotóxicas a partir de 24h de exposição.

A exposição de peixes aos xenobióticos resulta em alterações na atividade das enzimas antioxidantes, causadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), a formação da mesma e determinada pela perda ou ganho de um elétron, ficando um elétron desemparelhado.

Estudos recentes têm mostrado que muitos compostos químicos induzem as espécies reativas de oxigênio em células que induzem a contribuição da geração de estresse oxidativo, seguindo por danos no DNA, reduzindo o reparo do mesmo e aumentando a suscetibilidade de apoptose, fatores que levam a genotoxicidade e citotoxicidade (Figura 2.5). Os resultados obtidos em relação ao genótipo e citotoxicidade são considerados indicadores importantes de impacto de contaminantes em ecossistemas aquáticos uma vez que este tipo de efeito pode ser associado com distúrbios orgânicos que podem afetar a fertilidade, a saúde e o ciclo de vida dos organismos envolvidos (REYES *et al.*, 2015).

Outro exemplo que pode ser citado é a catalase (CAT – CE 1.11.6), ela é encontrada nos níveis mais elevados no fígado devido à quebra das toxinas presentes no sangue e no processamento de produtos metabólicos para degradação (COPKIN; ALTINOK, 2013). Os peixes podem combater os níveis elevados de ERO por ativação do sistema de defesa da CAT. Ferrari, Venturino e D'Angelo (2007) afirmam que pesticidas induzem a

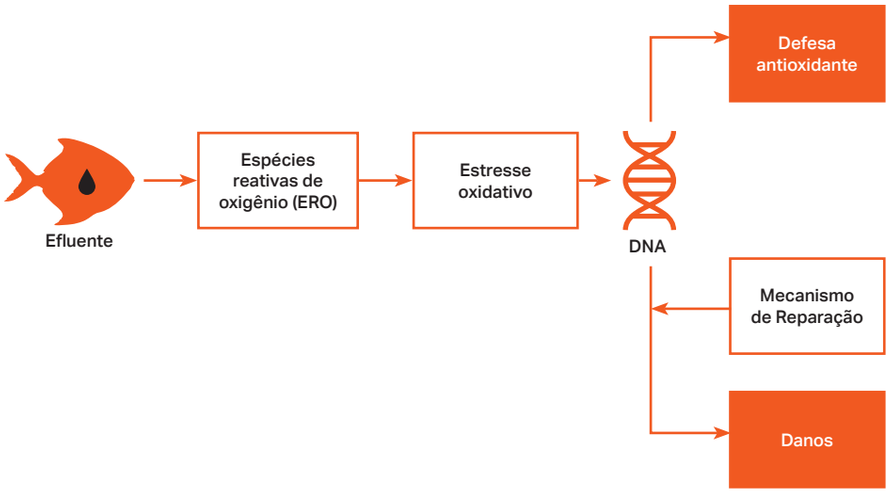


Figura 2.5 O estresse oxidativo nada mais é que a produção excessiva ao acumulo de espécies reativas de oxigênio no interior da célula, como ânion superóxido (O2-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxilos (OH). As ERO reagem com proteínas com material genético e inativam enzimas, baseado em Reyes *et al.* (2015).

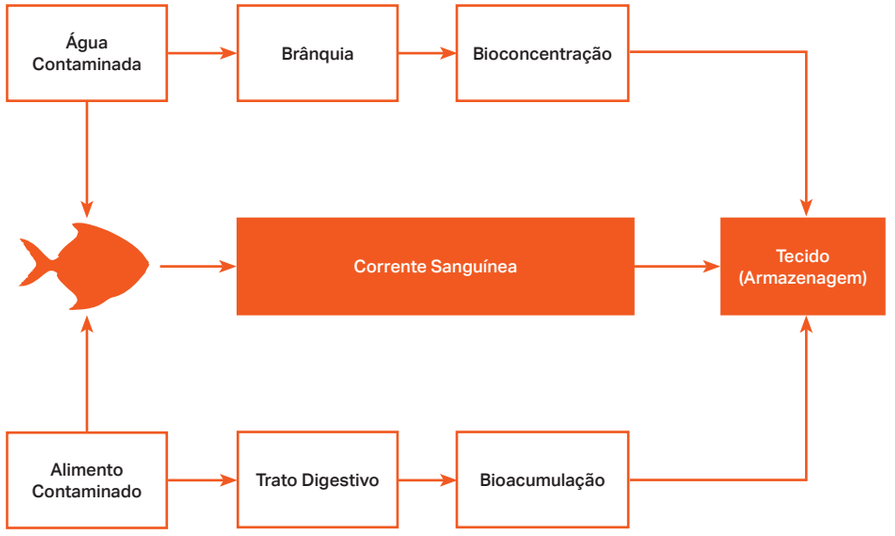


Figura 2.6 Modelo de bioacumulação e bioconcentração em peixes, baseado em Manahan (1991).

atividade da CAT nas primeiras 48h e, logo após, é seguida por um decréscimo da atividade. Capkin e Altinok (2013) encontraram o mesmo padrão quando expuseram truta arco-íris a metal pesado durante 60 dias. Existem atividades enzimáticas alteradas também por metais pesados, tal como a atividade da anidrase carbônica. A atividade da anidrase carbônica está envolvida na regulação osmótica, regulação da dinâmica do gás da bexiga natatória e no controle do pH (CRISTENSEN; TUCKER, 1976). Sabe-se que a enzima pode se ligar ao Cu, que, por sua vez, pode inibir a sua atividade (POLO; SCRIMSCHAW, 2011). Todos os estudos citados mostram que independentemente do contaminante e do nível de avaliação (indivíduo, tecido, bioquímico, genético e outros), os efeitos biológicos são observados na gônada e no fígado dos peixes.

Além dos efeitos observados, também pode-se citar a bioacumulação de contaminantes em peixes que pode ocorrer através de duas vias: a de captação direta da água, através das brânquias, e a dietética (Figura 2.6) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A ingestão de alimento contaminado pode ser responsável por altos níveis de contaminantes nos tecidos de peixes expostos a concentrações muito baixas destes na água. Outros fatores que podem também regular a biodisponibilidade do contaminante são a concentração elevada de cálcio e de magnésio, que pode reduzir a biodisponibilidade do composto, e a salinidade, que afeta a bioacumulação; em metais tem se registrado que a bioacumulação aumenta quando a salinidade diminui (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Em resumo, os peixes podem demonstrar respostas a vários efluentes em vários níveis de organização biológica, incluindo alterações nas respostas genéticas, bioquímicas nos órgãos e nos tecidos, bem como em todo o organismo, população e em níveis de comunidade. Eles são uma ferramenta eficaz para o monitoramento da condição ambiental dos sistemas fluviais e zonas costeiras e para avaliar as respostas em testes de laboratório. Para o Monitoramento de Efeitos Ambientais (MEA), os parâmetros utilizados incluem índices biológicos (índice gonadossomático, índice de condições, índice hepatossomático, maturação dos indivíduos), conteúdo estomacal, bioacumulação em tecidos e ensaios ecotoxicológicos.

2.2.2 Efeitos na Comunidade de Invertebrados Bentônicos

Além dos peixes, os invertebrados também são usados como indicadores de condição ambiental nos estudos de monitoramento. Apresentam respostas demográficas e dispersivas mais rápidas do que outros organismos com ciclos

de vida mais longo, representam a maior parte da biomassa animal total, são um grupo heterogêneo e diversificado, estão envolvidos em processos de ciclagem de nutrientes e desempenham papéis fundamentais nas cadeias tróficas dos ecossistemas aquáticos, sendo geralmente determinantes da velocidade da decomposição de restos vegetais e importante fonte de alimento para muitos vertebrados (ECOTUMUCUMAQUE, 2013).

O uso de invertebrados bentônicos como indicadores ambientais tem se dado tanto em testes laboratoriais, para avaliar a qualidade do sedimento e água, e no campo, para avaliar a saúde dos que ali vivem. Alguns grupos utilizam os sedimentos como nicho permanente, a ausência deles pode diagnosticar ambientes impactados, pois são sensíveis a variações temporais e a alguns compostos químicos (ECOTUMUCUMAQUE, 2013).

Existem grupos de espécies relacionados a um determinado agente poluidor ou a fatores naturais potencialmente causadores de efeitos (por exemplo, altas densidades de *Oligochaeta* e de larvas vermelhas de *Chironomus*) em rios com elevados teores de matéria orgânica. Além disso, são importantes ferramentas para a avaliação da integridade ecológica (condição de "saúde" de um rio, avaliada através da comparação da qualidade da água e diversidade de organismos entre áreas impactadas e áreas de referência, ainda naturais e a montante). Os bioindicadores mais utilizados são aqueles capazes de diferenciar entre fenômenos naturais (mudanças de estação e ciclos de chuva-seca) e fenômenos estressantes de origem antrópica, relacionados a fontes de poluição pontuais ou difusas (CALLISTO; GONÇALVES; MORENO, 2010).

Barbola *et al.* (2011) monitorou a represa de Alagados, em Ponta Grossa, no Estado do Paraná, a partir da estrutura da comunidade de invertebrados. A represa fica localizada na bacia do Rio Pitangui e as principais atividades econômicas ao redor do rio eram agrícolas, pecuária, suinocultura e avicultura. Foram avaliados 5 (cinco) pontos de amostragem e, no total foram coletados 18.473 exemplares de macroinvertebrados aquáticos pertencentes a 46 táxons dos filos *Annelida* (*Hirudinea* e *Oligochaeta*), *Mollusca* (*Gastropoda*), *Platyhelminthes* (*Turbellaria*), *Nematoda* e *Arthropoda* (*Arachnida*, *Crustacea* e *Insecta*). Os índices de diversidade (H') e equitabilidade (J) foram significativamente baixos para todos os pontos, com H' variando de 0,3301 a 1,0396. Quanto à tolerância dos organismos à poluição orgânica, alguns táxons mais sensíveis foram muito raros (*Plecoptera*) ou em baixa frequência (*Trichoptera* e *Ephemeroptera*). Entre os grupos mais resistentes a ambientes poluídos estão os *Chironomidae* e os *Hirudinea*, ambos bastante comuns nas amostras de Alagados.

Figura 2.7 Foto do Porto de Vila Velha – ES tirada pelo projeto Peixe Guia.

Os níveis de compostos químicos podem ser medidos em sedimentos e na água, entretanto os efeitos biológicos não. Nesse caso são usados os ensaios ecotoxicológicos para avaliação da biodisponibilidade dos poluentes e dos seus efeitos no ambiente aquático (SOUSA *et al.*, 2014).

Sousa *et al.* (2014) verificaram a frequência de toxicidade aguda de sedimento em *Tiburonella viscana* e *Leptocheirus plumulosus*, *Nitokra sp*, embriões de *Lytechinus variegatus* e de *Perna perna* através de ensaios ecotoxicológicos com amostras das áreas mais críticas na Baixada Santista. A maior frequência de toxicidade aguda observada foi em amostras do Canal de Santos (52%), seguido pelo Canal de São Vicente, Baía de Santos e Praia Grande, com 47% em cada área, enquanto os sedimentos das praias de Bertioga apresentaram menor frequência de efeito agudo (15%). Entre os organismos utilizados na avaliação do sedimento total, *T. viscana* foi mais sensível que *L. Plumulosus*, com 56,9% de frequência. O sedimento do Canal de Santos, Canal de São Vicente e Baía de Santos e da área de descarte do material dragado foram as regiões mais afetadas, enquanto que as Praias de Bertioga e Guarujá foram as de menor frequência de toxicidade.

Outro exemplo de monitoramento é o realizado com invertebrados gastrópodes para avaliar os efeitos das tintas anti-incrustantes (GODOI; FAVORETO; SILVA, 2003; CHOI *et al.*, 2009); estudos relatam imposex induzida em fêmeas de gastrópode (TILEY-O'NEAL; MUNKITTRICK; MACDONALD, 2011), que levam a falhas reprodutivas

(UNO *et al.*, 2011). Costa *et al.* (2014) monitorou a contaminação por butilestanho (BT) no sedimento associado com imposex em *Leucozonia nassa* e *L. ocellata* em um porto no Espírito Santo, Sudeste do Brasil (Figura 2.7). Os resultados demonstraram a ocorrência de concentrações elevadas de BT em o sedimento variando de 383,7 ng para 7172,9 g de Sn^{-1}, indicando uma contaminação grave da área, o que foi confirmado pelos resultados encontrados no monitoramento biológico que indicaram que o biocida desempenha um papel na distribuição das populações de ambas as espécies na área estudada.

Em resumo, as comunidades invertebrados bentônicos são também uma ferramenta útil para o monitoramento da qualidade ambiental. Para o MEA, foram utilizados os parâmetros de densidade, equitabilidade, riqueza e diversidade.

3 Delineamento do estudo e caracterização do local

Francisco Candido Cardoso Barreto
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick
Tatiana Heid Furley

3.1 **Considerações Gerais** p65

3.2 **Garantia e Controle de Qualidade** p67
3.2.1 Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) p67

3.3 **Caracterização da Área** p68
3.3.1 Delineamento da Pluma de Dispersão p71
3.3.2 Mapeamento e Classificação do *Habitat* p72
3.3.3 Inventário dos Recursos Hídricos p74
3.3.4 Esquema de Classificação para Seleção da Área de Referência p75
3.3.4.1 *Para Rios* p75
3.3.4.2 *Para Lagos* p76
3.3.4.3 *Para Ambientes Marinhos* p77
3.3.5 Ecorregiões p79
3.3.5.1 *Bacia de Drenagem e Escala Geográfica* p79
3.3.5.2 *Uso da Terra e Faixas de Mata Ciliar* p79
3.3.6 Delineamento do Estudo em Rios p80
3.3.6.1 *Segmento do Vale e Ordem do Rio* p80
3.3.6.2 *Unidade de Canal* p80
3.3.7 Delineamento do Estudo em Lagos p81
3.3.7.1 *Origem, Localização e Conectividade Hidrológica* p81
3.3.7.2 *Morfometria* p82
3.3.7.3 *Estado Trófico* p82
3.3.7.4 *Zona* p83
3.3.8 Uso dos Ensaios Ecotoxicológicos Crônicos para Escolha dos Pontos Amostrais p83

3.4 **Histórico e Operação do Empreendimento** p83

3.5 **Áreas de Exposição e de Referência** p83
3.5.1 Definição do Ponto Final de Descarga para o Monitoramento p84
3.5.2 Seleção de Áreas de Exposição e de Referência p84
3.5.3 Área de Exposição p84
3.5.4 Área Referência p85
3.5.5 Relatórios de Coordenadas dos Pontos Amostrais p87
3.5.6 Fatores de Confundimento p87

3.1 Considerações Gerais

Os guias técnicos produzidos pela Agência Ambiental Canadense (ENVIRONMENT CANADA, 2010, 2012) são um esforço notável para auxiliar empreendimentos industriais a cumprir as normas regulatórias expostas nas leis ambientais daquele país.

Há contribuições importantes que, uma vez implementadas e adaptadas à realidade dos programas de monitoramento ambiental aqui no Brasil, proporcionarão um enorme avanço na qualidade na qual esses procedimentos são planejados, realizados, analisados e interpretados.

Uma característica importante do guia publicado pela agência ambiental canadense é que o mesmo é re-avaliado ciclicamente seguindo um cronograma conjunto com os relatórios produzidos. A cada nova campanha são registradas dificuldades, erros e acertos dos métodos e esse conhecimento é discutido em *workshops* com especialistas e novas correções do programa de monitoramento são produzidas (COURTENAY *et al.*, 2002; BARRETT *et al.*, 2010; ARCISZEWSKI; MUNKITTRICK, 2015)

O guia levanta vários pontos importantes e entra em detalhes bastante específicos em relação a cada grupo animal ou variável ambiental, que deve ser mensurada e acompanhada durante o tempo de duração do monitoramento. O objetivo de um delineamento é descrever como os estudos de monitoramento biológico deverão ser conduzidos. É importante que aborde os seguintes tópicos:

- Um resumo dos estudos prévios de monitoramento biológico;
- Informações relacionadas à caracterização do local, incluindo estudos de resultados de delineamento de pluma;
- Os objetivos do programa de monitoramento, incluindo uma abordagem global e racional do monitoramento biológico, que deve ser baseado em resultados prévios de monitoramento, se possível;

- O delineamento estatístico e o critério utilizado para sua escolha as hipóteses, os métodos estatísticos que serão empregados e os dados necessários para as análises;
- A descrição de como o monitoramento biológico será conduzido para determinar se existem efeitos, levando em consideração influências externas que podem agir como fatores de confundimento;
- O plano de amostragem de campo, incluindo o que será mensurado, onde e quando será mensurado, locais de exposição e de referência e a análise racional para seleção do ponto final de descarga do efluente;
- Medidas de garantia e controle de qualidade que serão tomadas para assegurar a validade dos dados;
- Um cronograma que inclua o monitoramento de campo e submissão do relatório interpretativo.

O conteúdo apresentado e discutido neste capítulo é um conjunto de sugestões para o desenvolvimento de um delineamento amostral mais efetivo e menos sujeito aos diversos tipos de erros experimentais, de execução, analíticos ou interpretativos. O mesmo teve como base os guias canadenses de 2010 e 2012 (ENVIRONMENT CANADA, 2010, 2012).

É importante frisar que não existe a possibilidade de padronização exata de um esquema de monitoramento ambiental passível de ser replicado em todas as situações ou ambientes, ou seja, deve haver a adequação das metodologias caso a caso.

Não é incomum a existência de críticas em relação aos programas de monitoramento de efeitos ambientais. Estas se referem ao pouco rigor científico (por não declararem hipóteses formais ou as mesmas serem triviais ou por não conseguirem separar a variação natural do ambiente dos efeitos que desejam mensurar) (LEGG; NAGY, 2006), por serem muito caros (o que reflete um planejamento pobre que não soube definir e restringir as variáveis corretas a serem mensuradas, adotando um delineamento de pegue-e-amostre-tudo-o-que-puder) (FIELD *et al.*, 2004) ou que os dados obtidos por monitoramentos são inúteis como dados secundários para outros projetos ou análises (UNDERWOOD; CHAPMAN, 2002).

Sobre a última crítica, a maioria dos dados obtidos em monitoramentos ambientais encontram-se nesse momento ocupando espaço virtual em HDs de agências ambientais e/ou dos responsáveis por tais projetos. Estão indisponíveis ao público e, mesmo que estivessem disponíveis, são mal documentados e com baixa qualidade, o que limita seu uso em qualquer análise posterior fora do monitoramento de onde foram gerados.

Esses dados refletem o tipo de trabalho realizado com o simples objetivo de cumprir algum requisito legal exigido por alguma agência de controle ambiental. O problema maior desse tipo de dado é que é comum, aos envolvidos no processo a ilusão de produtividade gerada pelo tremendo esforço gerado na obtenção dessas informações em campo e na acumulação dos mesmos em inúmeras planilhas eletrônicas (FIELD *et al.*, 2007).

Para minimizar esses problemas e tentar garantir que o máximo de informação seja obtida dos dados, é sugerida a implementação dos itens que serão discutidos ao longo deste capítulo.

3.2 Garantia e Controle de Qualidade

Há uma discussão em todos os capítulos deste guia sobre a necessidade de implementação e manutenção de procedimentos de Garantia e Controle de Qualidade (GQ/CQ). Esses procedimentos incluem avaliações adequadas, auditorias e controle de qualidade interno do laboratório que está realizando as análises. O objetivo é garantir que os procedimentos de amostragem em campo e análises laboratoriais produzam resultados tecnicamente sólidos e cientificamente defensáveis (SHANLEY *et al.*, 2013).

A Garantia de Qualidade (GQ) define a forma em que as tarefas são realizadas de modo a assegurar que os dados satisfaçam objetivos predefinidos para uso dos dados (NI; ZENG; ZENG, 2011; DORGERLOH *et al.*, 2012). Isso só é possível quando um Delineamento de Controle de Qualidade do Serviço (DCQS) for definido. Os DCQS são normalmente derivados de usos pretendidos dos dados (por exemplo, as hipóteses a serem testadas, as estatísticas descritivas envolvidas e a incerteza total que pode ser tolerada). Como incerteza entende-se toda fonte de imprecisão, seja de origem analítica, de amostragem ou ambiental mais qualquer viés que possa ocorrer, tais quais as discutidas por Taylor (1987) e Hurlbert (1984).

3.2.1 Procedimentos Operacionais Padrão (POPs)

Procedimentos operacionais padronizados (POPs) são fundamentais para qualquer programa de controle e garantia de qualidade. Todos os procedimentos de campo e de laboratório devem ser realizados de acordo com os POPs a fim de garantir o controle de qualidade. Os POPs devem descrever em detalhe os:

- Requisitos dos procedimentos de obtenção de dados em campo para os métodos de amostragem, manuseio de amostras, rotulagem, equipamentos, preservação e manutenção de registros;
- Métodos e procedimentos analíticos, de manipulação de amostras, de rotulagem, de equipamentos, implementação de sistemas de teste, manutenção de registros de todas as análises de laboratório.

Cada POP deve ser um método escrito detalhado acessível a cada analista. Os POPs devem basear-se em procedimentos desenvolvidos por uma organização de padronização de normas, tal como o Inmetro ou ISO.

Onde os métodos não são bem validados, é recomendável que o POP seja completamente referenciado com a literatura relevante e contenha todos os elementos descritos em CALA (1991).

A validação dos dados interna deve ser anexada ao POP e conter os procedimentos de GQ/CQ, incluindo os tipos e frequências das amostras de CQ a serem analisados, os níveis esperados de precisão, exatidão e recuperação e os limites de detecção dos métodos.

Embora os procedimentos de análise química tendem a ser razoavelmente bem documentados, procedimentos de amostragem em geral são frequentemente ignorados. A amostragem incorreta é um erro grave e muitas vezes dominante da incerteza em mensurações ambientais.

Os POPs que incluam operações de campo vão ajudar a quantificar ou reduzir esta incerteza. Toda equipe de campo deve estar familiarizada com os POPs.

3.3 Caracterização da Área

Para estudos subsequentes do programa de Monitoramento de Efeitos Ambientais (MEA) a caracterização do local pode ser submetida em formato resumido, mas quaisquer novas informações relevantes devem ser atualizadas em detalhes.

Na maioria dos casos, os empreendimentos terão informações disponíveis de caracterização local obtidos em alguma avaliação prévia. Essas informações são necessárias para prover uma base adequada para o delineamento inicial do programa de MEA.

A caracterização do local é utilizada para identificar áreas adequadas para amostragem que tenham *habitats* similares nas áreas de exposição e referência e para identificar fatores de confundimento que possam influenciar, de alguma forma, a interpretação dos resultados (KILGOUR *et al.*, 2007; JONES; PETERMAN, 2012). A Tabela 3.1 reúne as informações necessárias para caracterização do local que devem estar incluídas no delineamento.

Muitas das informações de caracterização do local podem ser efetivamente representadas sob a forma de um mapa (Figura 3.1). Tais mapas devem apresentar uma escala suficiente (por exemplo, 1:5000) para mostrar as configurações da área de estudo em detalhe adequado. A extensão geográfica da área de estudo para ser mapeada deve ser determinada a cada caso específico, mas deve sempre incluir o ponto de despejo do efluente assim como as áreas de exposição e de referência.

Figura 3.1 Caracterização do local e escolha dos pontos de coleta. Projeto Peixe Guia.

Tabela 3.1 Informações necessárias para caracterização do local e delineamento do MEA.

Tipo de informação	Informações recomendadas para registro
Características gerais	Substrato rochoso e geologia de superfície; Topografia; Solo e vegetação; Acessibilidade; Climatologia.
Hidrologia	Descrição da bacia hidrográfica; Características de fluxos de água (rios), ou dispersão (lagos, estuário); Descrição geral de como efluente(s) se mistura(m) com águas receptoras; Mapeamento batimétrico (incluindo inclinação em ambiente marinho); Declive (rios); Marés (marinho) media mensal da altura da maré; Padrões de estratificação (térmico e químico); Barreiras naturais ou antropogênicas para o movimento dos peixes; Delimitação da pluma de dispersão do efluente; Coordenadas GPS de todos os pontos de amostragem; Informações sobre o acesso a esses locais; Informações sobre pontos amostrais utilizados em outros programas de monitoramento (caso existam).
Influências antropogênicas	Docas, cais, terminais de barcos (Ferry), marinas, píeres, zonas de lazer públicas; Pontes, cruzamentos e travessias; Captação de água, descargas de efluentes, descargas de águas pluviais, vazão de esgotos transbordantes; Local de coleta de lixo; Inventário de fontes contaminantes, incluindo as fontes difusas; Barragens, pontões, cachoeiras e outras barreiras ao movimento dos peixes; Uso da terra circundante; Localização de instalações aquícolas.
Características de recursos aquáticos	Localização de áreas de exposição e referência usadas em estudos anteriores; Espécies de peixes, crustáceos e moluscos presente (residentes e migratórias); Abundância relativa das espécies de peixes e moluscos; Uso da área de exposição e de referência de peixe e marisco (locais de desova, áreas de viveiro etc); Espécies de peixes raros ameaçadas ou em perigo (se houver); Peixarias não comerciais (recreativa e de subsistência); Peixarias comerciais; Zonas de crescimento de macrófitas; *Habitat(s)* ecologicamente relevante de invertebrados bentônicos e suas proporções relativas, incluindo:delimitação de zonas de deposição e erosão; Classificação de substrato.
Práticas e sistemas de proteção ambiental	Gerenciamento de água; Tratamento de efluentes; Tempo de residência.

Fonte: Environment Canada (2010).

3.3.1 Delineamento da Pluma de Dispersão

Como parte do processo de descrição do local, é necessário entender como o efluente se mistura dentro da área de exposição, incluindo uma estimativa da concentração do efluente na água em 100 e 250 metros, respectivamente, de cada ponto de lançamento do efluente na água.

Esta descrição deve incluir uma indicação da vazão relativa do efluente e do corpo hídrico receptor, assim como as variações sazonais da vazão do efluente e do rio. É importante indicar a densidade do efluente e onde dentro da coluna de água o efluente provavelmente está antes de ser completamente diluído. Esta estimativa pode ser baseada em mensuração direta em campo ou na modelagem, mas é recomendado que a modelagem seja validada com as medidas de campo (HUYSMANS; DASSARGUES, 2009).

Caso a concentração do efluente seja maior do que 1% em um ponto de coleta à 250 metros de seu lançamento, deve ser levado a cabo um estudo biológico. Caso a concentração seja maior que 1% a 100 metros de seu lançamento, devem ser realizados estudos mais rigorosos sobre a pluma de dispersão (JAMES; OSIENSKY; DONALDSON, 1994).

É recomendado que a descrição da maneira na qual o efluente se mistura dentro da área de exposição inclua o seguinte:

- Identificação da localização do efluente na área de exposição, antes de se misturar com a água receptora;
- Estimativa na área de exposição, onde o efluente e a água receptora começam a se misturar e onde a mistura está completa;
- Estimativa da taxa de diluição do efluente em pontos a jusante da descarga de efluentes;
- Identificação de outras fontes de diluição significativa, além do receptor primário (por exemplo afluente ou outro córrego);
- Como os itens acima variam de acordo com as marés e as estações. Para detalhes sobre a delimitação da pluma, consulte Revised Technical Guidance on How to Conduct Efluente Pluma Delineation Studies[1].

1 Disponível em https://www.ec.gc.ca/esee-eem/E93AE5BC-89C6-4701-AED7-FE-F2A4AC2D7A/Plume_Delineation_Report_ e.pdf.

3.3.2 Mapeamento e Classificação do *Habitat*

A caracterização do *habitat* inclui alguns elementos de classificação e mapeamento, assim como inventário de recursos aquáticos. O uso de mapas detalhados pode ser útil em identificar tipos de *habitat* presentes nas áreas de exposição e áreas de referência.

O método recomendado para criar o mapa do *habitat* é realizar uma classificação do mesmo baseado no modelo de classificação desenvolvido pelo U.S. Fish and Wildlife Service, Classification of Wetlands and Deepwater Habitats of the United States (COWARDIN *et al.*, 1979; BUSCH; SLY, 1992). Este sistema permite a classificação de uma grande variedade de *habitats* continentais, aquáticos e semiaquáticos. Cowardin *et al.* (1979), também fornece orientações sobre a descrição de *habitat* para situações estuarinas e costeiras, mas é importante consultar o trabalho de Courtenay *et al.* (2002), pois apresenta recomendações específicas para esses tipos de ambientes.

Pode-se encontrar abaixo exemplos de condições específicas de ambientes para vários *habitats*:

- **Rios** — recomenda-se que as descrições do *habitat* do rio incluam informações sobre gradiente de altitude; a localização de barragens, quedas e outras barreiras à migração de peixes; média da vazão de descarga anual; e características de substrato geral de cada rio (de preferência sob a forma de um gráfico de perfil de gradiente). Entradas a montante e a jusante (por exemplo, águas pluviais, esgoto que transbordam, efluente de outros moradores industriais) devem ser mapeados e descritos;
- **Lagos** — recomenda-se incluir dados sobre batimetria, localização das principais entradas e saídas, e as condições gerais de temperatura de oxigênio (por exemplo, estratificação térmica, ocorrências de depleção de oxigênio em águas profundas);
- **Litorais abertos** — sugestão de parâmetros de mapeamento adicionais para linhas costeiras abertas (marinho, grandes lagos) incluem curvas de profundidade, características do substrato perto da costa, a configuração do litoral, e a localização de influxo de rios e outras descargas, as correntes e grandes modificações no *habitat*;

Figura 3.2 Coleta piloto para inventariar as espécies de peixes sentinelas no estuário do Rio Benevente, em Anchieta – ES, e escolha das espécies sentinelas usadas no Projeto Peixe Guia.

- **Estuários** — são melhores descritos em termos de seus gradientes de salinidade, vazão, batimetria e características gerais do substrato. Uma descrição dos ciclos de maré é recomendada para cada ponto de amostragem do estuário. A maioria das características acima pode ser descrita a partir de mapas de navegação, mapas topográficos, registros de marés e descarga do rio, e através de entrevistas com funcionários do governo local e população local.

As zonas de deposição na área de exposição devem ser identificadas e representadas no mapa de *habitat*. Qualquer informação sobre caracterização de sedimento (química, toxicidade) deve ser registrada. Zonas de deposição ocorrem onde a velocidade da água diminui, resultando na sedimentação das partículas que estavam em suspensão; as partículas mais finas sedimentam sob velocidades mais lentas.

Dados sobre ocorrência histórica de alguma contaminação ou sobre a comunidade de invertebrados bentônicos podem ser úteis na identificação de estações de amostragem dentro de uma área de exposição deposicional.

3.3.3 Inventário dos Recursos Hídricos

Um inventário dos recursos hídricos inclui a identificação de peixes e de moluscos (residentes e transitórios) que estão atualmente sendo pescados comercialmente e não comercialmente.

De forma ideal, um inventário deve focar nas espécies de peixes que estejam presentes em número suficiente para serem consideradas espécies sentinela, e na utilização do ambiente (por exemplo para desova ou viveiros) da área de exposição por estas espécies. É particularmente perigoso o uso de espécies comerciais ou de uso pela pesca recreativa para propósitos de monitoramento, pois torna-se difícil separar os efeitos da pesca dos efeitos do efluente principalmente nas variáveis individuais como crescimento, ou a nível populacional, como a abundância. Além disso, quaisquer espécies reconhecidas pelas autoridades federais, municipais ou territoriais como raros, ameaçados ou em perigo devem ser incluídos no levantamento e os procedimentos de amostragem devem levar isso em consideração para minimizar os potenciais feitos negativos sobre essas espécies.

O sucesso de um programa de MEA aumenta com a familiaridade da área de estudo. Caso não existam registros históricos ou recentes sobre o local, recomenda-se que os estudos iniciais para caracterização da área sejam conduzidos através de trabalhos de campo para gerar essa informação (Figura 3.2).

Uma vez que a caracterização do local esteja completa, o delineamento amostral básico deve ser avaliado. Delineamentos caem em geral em três categorias básicas com diferentes abordagens filosóficas (para maior descrição dessas abordagens, ver Environment Canada, 2010):

- Delineamentos do tipo Controle-Impacto (C-I), incluindo aqui o delineamento BACI (avaliação do impacto antes e depois do controle) e avaliação de impacto com múltiplos controles; ambos delineamentos são do tipo ANOVA e utilizados para detectar diferenças discretas entre áreas de exposição e de referência;
- Delineamentos de gradiente (incluindo gradiente simples, radial e gradiente múltiplo) são utilizados para investigar mudanças em sistemas biológicos ao longo de um gradiente físico (um efluente, por exemplo) e são melhor analisados através do uso de análises de regressão ou análises de covariância (ANCOVA);
- Um *design* multivariado como a abordagem de condições de referência (RCA) que compara estações potencialmente impactadas contra um conjunto de estações referência.

A decisão sobre qual delineamento básico será adotado no estudo irá determinar a localização potencial das estações de amostragem e o número de áreas de referências necessárias.

3.3.4 Esquema de Classificação para Seleção da Área de Referência

A robustez dos resultados e da interpretação de um MEA dependerá da qualidade e do grau de comparabilidade das áreas de referência selecionadas. Enquanto alguns estudos adotam apenas um local como referência, a utilização de mais de uma área de referência proporciona uma melhor indicação da amplitude da variação natural dos dados e maior robustez das conclusões.

Como as áreas de referência irão variar entre diferente paisagens, as abordagens têm sido desenvolvidas para classificar o terreno pelo qual os rios correm ou em que lagos residem a fim de prever conjuntos bióticos aquáticos (CORKUM, 1989, 1992; HUGHES, 1995; MAXWELL *et al.* 1995; OMERNIK, 1995).

Um sistema de classificação é uma forma de simplificar os procedimentos de amostragem e estratégias de gestão através da organização de uma paisagem variável (CONQUEST; RALPH; NAIMAN, 1994).

O pressuposto é que o esquema de classificação seja hierárquico. A vantagem de um esquema de classificação hierárquico é que ela "proporciona um modo de discriminar entre as características da paisagem em várias escalas de resolução" (CONQUEST; RALPH; NAIMAN, 1994).

Os seguintes pontos específicos devem ser considerados durante a seleção das áreas:

3.3.4.1 Para Rios

- O tamanho da bacia de drenagem selecionado é baseado na ordem do rio. Por exemplo, se um empreendimento local está localizado em um córrego de segunda ordem, a área da bacia de drenagem é delineada no ponto onde o rio se torna de terceira ordem (por exemplo, na junção de dois cursos de segunda ordem);

- Se não há entradas a montante ou fatores de confundimento, a área de referência pode estar dentro da bacia de drenagem e a montante do empreendimento;
- Se existem fatores de confundimento, tais como entradas difusas pontuais ou não pontuais ocorrendo a montante do efluente, as áreas de referência podem ser selecionadas na bacia de drenagem mais próxima que apresente características de *habitat* comparáveis;
- Se a perturbação física do vale do rio está associado com o empreendimento, os efeitos dos efluentes podem ser confundidos pela perturbação. Consequentemente, as zonas de referência devem ser selecionadas para corresponder a perturbação física, se possível.

As seguintes características devem ser similares entre as áreas de referência e áreas de exposição: a ecorregião, área da bacia de drenagem, ordem do rio, largura total, vertente do canal, gradiente do canal, tipos de *habitat*, a profundidade da água, composição do substrato, velocidade da água, vegetação ciliar, estrutura de linha de costa, uso da terra etc.

3.3.4.2 Para Lagos

- Em lagos com um efluente de um só empreendimento e sem fontes difusas de poluição, a esfera de influência proveniente do efluente deve ser determinada. Isto é particularmente importante para os lagos, em que o fluxo de efluente não é unidirecional;
- Se a delimitação de uma pluma de efluente e estudos anteriores indicam que os efeitos do empreendimento são localmente restritos, devem ser selecionadas áreas de referência dentro do lago em que ocorre a descarga do empreendimento. Estas áreas de referência devem estar localizadas em baías ou bacias do lago separadas, mas comparáveis entre si;
- Se a delimitação de uma pluma efluente indica que o efluente é dispersado por todo o lago, devem ser selecionadas áreas de referência no lago comparável mais próximo dentro da mesma bacia de drenagem ou adjacente;
- Caso existam entradas pontuais ou não pontuais dispersas no lago, as áreas de referência devem ser selecionadas em lagos comparáveis nas proximidades dentro da mesma bacia de drenagem ou adjacente;
- Se o efluente do empreendimento está associado a perturbação física na área, os efeitos dos efluentes podem ser confundidos pela perturbação. Consequentemente, devem ser selecionadas áreas de referência fisicamente similares, se possível.

As seguintes características devem ser similares entre áreas de referência e de exposição: ecorregião, origem geológica, área de bacia de drenagem, morfometria, inclinação da linha de costa, tipos de *habitat*, composição do substrato, vegetação ciliar, estrutura de linha costeira, uso da terra etc.

3.3.4.3 Para Ambientes Marinhos

- A área referência deve estar dentro da mesma massa de água e regime hidrográfico e de marés da área de exposição. Em outras palavras, quanto mais perto da área de referência estiver a área de exposição melhor. Comunidades de invertebrados bentônicos em ecossistemas marinhos apresentam maior riqueza de espécies e têm mais relações tróficas complexas, diferentes faixas de tamanho e diversidade de estratégias reprodutivas do que comunidades de invertebrados bentônicos em ecossistemas de água doce. Devido a essa complexidade e à multiplicidade de interações entre espécies de invertebrados bentônicos marinhos, pequenas mudanças nas condições físicas ou químicas podem alterar drasticamente a comunidade bentônica. É extremamente raro que uma comunidade de invertebrados bentônicos seja similar a outra de uma baía diferente e isso se deve à dinâmica complexa da deriva e ao assentamento das larvas nesses ambientes e das barreiras físicas complexas presentes. Dado o exposto, é muito difícil prever a estrutura da comunidade desses animais baseado apenas nos fatores e características do sedimento presente. Essa similaridade de fauna bentônica será maior

quanto mais fluxos de correntes existirem em comum nos locais, realizando um intercâmbio constante de larvas entre os locais. Consulte Snelgrove e Butman (1994) para uma discussão mais profunda sobre isso;

- Áreas de referência que não se localizam na mesma massa de água ou regime hidrográfico da zona de exposição podem ser adequadas apenas para comparações de variáveis mais simples, como mudanças na abundância ou riqueza de espécies. Se as condições do *habitat* são suficientemente semelhantes à área de exposição, podem ser comparados fatores bióticos em maior escala, tais como a presença de táxons específicos, conforme definido por Thorson (1957) como "comunidades paralelas";
- Áreas de referência e exposição devem ter um tipo muito semelhante de *habitat*, estrutura do litoral (íngreme, montanhoso, delta, pântano etc.), topografia do fundo (soleiras, bancos de areia, exposto a influências oceânicas etc.), tipo de substrato (tamanho de partícula, triagem, química natural), profundidade, regimes das correntes, propriedades físicas de água, ciclos de nutrientes e características de drenagem;
- Algumas considerações especiais são importantes para determinar a adequação das áreas de referência para empreendimentos marinhos e estuarinos. Os fatores físicos no ambiente estuarino/marinho que tendem a ser mais complexos do que em água doce são: a salinidade (incluindo influência sazonal de água doce), marés (e correntes de maré) e sulfetos nos sedimentos. Outros fatores físicos importantes incluem a correnteza ou acúmulo, estagnação de coluna de água devido ao grande escoamento de água doce do verão, estouro de barragens, ressuspensão, assoreamento ou inundação periódica;
- Além das importantes características acima, os seguintes pontos específicos devem ser semelhantes entre as áreas de referência e de exposição: região entremarés, inclinação do litoral, exposição às ondas e à luz, presença de vegetação costeira e fauna incrustante, estabilidade da coluna de água e oxigênio de fundo.

3.3.5 Ecorregiões

O primeiro passo na seleção do local de referência é usar atributos terrestres (ecorregiões) com características semelhantes. Ecorregiões são definidas como "parte de uma ecoprovíncia caracterizada por respostas ecológicas distintas para clima expressas pela vegetação, solos, água e fauna" (WIKEN, 1986; WICKWARE; RUBEC, 1989).

3.3.5.1 Bacia de Drenagem e Escala Geográfica

Bacias hidrográficas ou de drenagem têm limites claros. Uma bacia de drenagem é definida como a área que tem uma saída comum para o seu escoamento superficial. Embora ocorra transferência de biota interbacias, sabe-se que as histórias geoclimáticas de grandes bacias (1:2.000.000) limitam a dispersão através de barreiras hidrográficas e clima (MAXWELL *et al.*, 1995).

Bacias de drenagem podem ocorrer dentro de uma ecorregião ou podem atravessar diferentes ecorregiões. Há uma maior similaridade de fauna aquática nas comunidades que ocupam a mesma ecorregião do que ecorregiões distintas (CORKUM, 1992; HUGHES *et al.,* 1994).

3.3.5.2 Uso da Terra e Faixas de Mata Ciliar

Embora ecorregiões sejam definidas em termos de clima e vegetação natural, a vegetação natural é perturbada com o desenvolvimento humano. O tipo de uso da terra é uma medida simples de perturbação dentro da bacia de drenagem.

Se houver uma mudança no uso da terra (por exemplo, o desmatamento para fins agrícolas ou agropecuário, exploração madeireira ou fogo), a acumulação biológica em águas receptoras irá responder a essas mudanças (CORKUM, 1992, 1996). Assim, a seleção de locais para monitoramento deve ser compatível com o uso da terra.

O grau (largura e tipo) da mata ciliar adjacente aos rios e lagos deve ser registado em todas as áreas de amostragem. Nas zonas de referência, onde o distúrbio humano não pode ser evitado, a presença da mata ciliar modera as flutuações de temperatura através de sombreamento (BUDD *et al.*, 1987), remove ou reduz os sedimentos de escoamento (YOUNG; HUNTRODS; ANDERSON, 1980), e regula nutrientes e metais que entram na massa de água (PETERJOHN; CORRELL, 1984).

3.3.6 Delineamento do Estudo em Rios

O esquema de amostragem em rios permite uma caracterização de *habitats* em múltiplas escalas (MEADOR *et al.*, 1993). Rios são organizados no espaço geográfico de forma hierárquica seguindo critérios geomorfológicos distintos e a forma como eles mudam ao longo do tempo (FRISSELL *et al.*, 1986). O sistema fluvial tem vários níveis hierárquicos ou aninhados: a bacia hidrográfica, segmentos do vale, setor do rio e unidade de canal (CONQUEST; RALPH; NAIMAN, 1994).

3.3.6.1 Segmento do Vale e Ordem do Rio

Segmentos do vale são seções distintas de bacia de drenagem que possuem propriedades geomorfológicas e características de transporte hidrológico que os distinguem de outros segmentos (CUPP, 1989). Montgomery e Buffington (1993) identificaram três tipos segmento do vale: coluviais (sedimentos não consolidados, canalizados e/ou não-canalizados), aluviais e rochosos.

Segmentos do vale podem ser preenchidos com *colluvium* (sedimento e matéria orgânica de deslizamentos de terra) ou de limo (sedimento transportado pelo fluxo). O terceiro segmento de vale tem pouco solo e é dominada pelo assoalho rochoso.

Segmentos do vale distinguem-se por seis critérios (CONQUEST; RALPH; NAIMAN, 1994):

- Ordem do rio (posição na rede de drenagem);
- Inclinação (e deslizamentos) do vale;
- Razão entre a amplitude do fundo do Vale e a largura do canal ativo;
- Gradientes do canal;
- Depósitos superficiais geomórficos do córrego;
- Padrão do canal.

3.3.6.2 Unidade de Canal

Unidades de canal são subdivisões dos trechos de um rio que descrevem *microhabitats* uniformes (profundidade e vazão) e são usados para identificar os fatores que limitam invertebrados e populações de peixes dentro de um trecho. Hawkins *et al.* (1993) propuseram um sistema de três níveis de unidades de canal em que o primeiro nível distingue corredeiras de poças. O segundo nível é identificado por corredeiras turbulentas e não turbulentas e se distingue entre poças formadas por erosões ou represas. Poças represadas retém bastante sedimento e detritos. A terceira subdivisão identifica *microhabitats* com base em processos e estrutura hidráulica. Unidades de canal apresentam cerca de 10 m ou menos e normalmente não podem ser mapeados em uma escala apropriada para a gestão da terra.

Critérios para a subdivisão de corredeiras incluem:

- Perfil de declive ou superfície da água;
- Porcentagem de fluxo supercrítico;
- Irregularidade do leito;
- Velocidade média;
- Grau de desenvolvimento.

Critérios para a subdivisão de poças incluem:

- Localização (canal principal ou canal secundário);
- Perfis de profundidade de corte longitudinal e transversal;
- Características do substrato;
- Limitantes à formação das poças.

3.3.7 Delineamento do Estudo em Lagos

A origem geológica, hidrológica e morfométrica (obtida a partir de mapas e fotografias aéreas) de lagos são importantes para identificar interações de sedimentos em água e produtividade dos lagos (WETZEL, 1975).

Embora a estratificação térmica possa ser prevista a partir de características morfológicas, é necessária verificação em campo. A escala de mapeamento para lagos é tipicamente 1:24.000 e 1:63.000 (MAXWELL *et al.*, 1995).

3.3.7.1 Origem, Localização e Conectividade Hidrológica

Pontos de monitoramento de referência e na área de exposição em lagos devem ter a mesma origem, localização e conectividade hidrológica. A geologia dos lagos, em última instância, afeta as características químicas, físicas e biológicas dos corpos de água. A conectividade hidrológica refere-se à "ligação de um lago de águas superficiais ou subterrâneas" e pode prever informações sobre a biota do lago (MAXWELL *et al.*, 1995).

Maxwell *et al.* (1995) descrevem três tipos de interações de hidrologia: conectividade ribeirinha (desvios e/ou entradas), conectividade de água subterrânea (ganhando, perdendo, neutro ou sem recarga) e regime de armazenamento de água (perene ou intermitente).

3.3.7.2 Morfometria

A morfometria dos lagos tem sido usada historicamente para prever a produção de peixes (RYDER, 1965; KERR; RYDER, 1988) e para determinar a diversidade de espécies (EADIE; KEAST, 1984; MARSHALL; RYAN, 1987). Excetoa a profundidade (e volume), outras características podem ser obtidas a partir de mapas.

Gráficos de hipsografia são úteis para comparar as formas de bacias de lagos e prever a área de superfície ou volume para o controle do nível de água dos reservatórios. Características morfológicas comuns de lagos incluem área de superfície, volume, profundidade média e máxima, o desenvolvimento litoral e o tempo de residência hidráulico.

3.3.7.3 Estado Trófico

Muitos sistemas de classificação de lagos são baseados em uma medida de produtividade (oligotrófico, mesotrófico, eutrófico). Um quarto tipo lago (distrófico) é usado para descrever lagos que recebem grandes quantidades de matéria orgânica a partir de fontes externas; estes lagos são fortemente manchados e conhecidos como lagos de água marrom.

A produtividade de lagos distróficos é baixa e, por isso, alguns limnologistas agrupam lagos distróficos como uma subclasse de lagos oligotróficos. As seguintes variáveis foram utilizadas para descrever o estado trófico de lagos:

- Oxigênio dissolvido
- Mistura térmica (estratificação do lago)
- Fósforo total
- Fósforo solúvel
- Nitrogênio total
- Nitrito e nitrato
- Amônia
- Clorofila *a*
- Transparência
- Matéria orgânica

3.3.7.4 Zona

Os lagos são subdivididos em uma zona pelágica de águas abertas, uma linha costeira ou zona litorânea habitada por vegetação autotrófica e uma zona mais profunda região bentônica livre de vegetação. Os pontos amostrais de referência e de exposição devem sempre ser localizados na mesma zona.

3.3.8 Uso dos Ensaios Ecotoxicológicos Crônicos para Escolha dos Pontos Amostrais

Dados históricos de ecotoxicidade crônica do efluente poderão ajudar na determinação da área no corpo hídrico possivelmente afetada pelo mesmo, caso não existam dados pretéritos da comunidade de invertebrados bentônicos e da ictiofauna que já indiquem onde deverão estar localizados os pontos de amostragem.

3.4 Histórico e Operação do Empreendimento

Dados históricos em relação ao empreendimento, especialmente o processamento e o tratamento de efluentes e sua vazão de descarte, devem ser registrados, pois podem afetar os resultados e sua interpretação. Esta informação é fundamental para a seleção da área de estudos.

3.5 Áreas de Exposição e de Referência

Uma área é qualitativamente definida para efeitos de amostragem e refere-se à escala geográfica adequada abrangendo a localização de um ou mais pontos de monitoramento.

Um ponto de amostragem é um ponto fixo que pode ser reconhecido, re-amostrado e definido quantitativamente (por exemplo, por sua latitude/longitude). Dentro do programa de MEA, a área total do estudo é subdividida em áreas de referência e de exposição (para projetos de controle de impacto) ou na área de exposição onde há concentrações de efluentes em gradiente decrescente.

A definição para área de exposição é “todo o *habitat* dos peixes e águas frequentadas por peixes que estão expostos ao efluente”, e sua definição de área de referência é “água frequentada por peixes que não sejam expostos a efluente e que tem o *habitat* dos peixes que, tanto quanto possível, seja semelhante ao da área de exposição”.

3.5.1 Definição do Ponto Final de Descarga para o Monitoramento

Nos casos em que o empreendimento tem mais de um ponto de descarga de efluentes, é recomendável a amostragem que seja feita em uma área de exposição onde o efluente tem o maior potencial para ter um efeito adverso sobre os ambientes de recepção.

Ao selecionar o ponto de descarga final, devem ser considerados: o local com as concentrações mais altas do efluente, a maneira na qual o efluente se mistura na área de exposição e a sensibilidade dos ambientes de recepção.

3.5.2 Seleção de Áreas de Exposição e de Referência

A seleção das áreas para amostragem é um dos componentes mais críticos do delineamento do estudo e deve ser considerada com cuidado para maximizar a qualidade da informação obtida. No entanto, isto é uma orientação e não limita a flexibilidade do empreendimento propor outros delineamentos que sejam adequados para o local.

3.5.3 Área de Exposição

A amostragem dentro da área de exposição deve ser feita numa região próxima à descarga do efluente onde os efeitos podem ser encontrados. As áreas de amostragem devem, idealmente, apresentar tanto o *habitat* adequado para a comunidade de invertebrados bentônicos quanto as populações das espécies de peixes selecionados.

O delineamento também deve considerar como é o uso da área de exposição por espécies de peixes (por exemplo para desova, viveiros etc.). A identificação da área de exposição e de suas características de *habitat* deve preceder a seleção de áreas de referência, porque as áreas de referência, na medida do possível, devem corresponder às características da área de exposição.

Dentro de uma área de exposição, devem haver pontos amostrais próximos (com concentração máxima do efluente) e pontos amostrais distantes (para determinar a magnitude e extensão geográfica dos efeitos).

A zona de descarga inicial é a área onde o efluente ultrapassa a velocidade das águas receptoras e o efluente é flutuante. A zona de descarga inicial é muitas vezes caracterizada pela turbulência visual e normalmente não se estende mais de 50 m do emissário.

Pelo menos uma das estações de campo deve ser mais próxima possível do ponto de descarga de efluentes, mas situado fora da zona de descarga inicial. A área de exposição estende-se geograficamente até um ponto de retorno das condições encontradas na área de referência.

3.5.4 Área Referência

A área referência não precisa representar condições originais, intocadas pela civilização. Ela pode incluir uma área em que os impactos antropogênicos, não relacionados com o efluente do empreendimento, são semelhantes aos da área de exposição (SIMON, 1991; OMERNIK, 1995).

Sempre que possível, a área de referência deve estar localizada na mesma massa de água, a montante do ponto de descarga do efluente e/ou além de qualquer influência da descarga a jusante. A área de referência deve ser adequada física e biologicamente, e estar fora da influência do empreendimento ou de outros fatores de confundimento.

Quando um empreendimento está localizado em uma das cabeceiras e/ou onde não há nenhuma área de referência adequada no mesmo corpo d'água, a área de referência deve estar localizada em um corpo de água adjacente com características semelhantes ou em afluente que não receba impacto. Uma outra possibilidade é adotar um delineamento em gradiente, onde são realizadas um número maior de amostragens com um distanciamento gradativo do ponto de descarga, representando um gradiente de exposição. Em alguns casos, pode-se utilizar mais do que uma área de referência.

Quando existem dados históricos de monitoramento, a empreendimento deve considerar o uso das mesmas áreas de amostragem de estudos anteriores, desde que sejam apropriados para uso no MEA atual. Isso ajudará a garantir que os dados de monitoramento coletados como parte do MEA podem ser comparados com os dados históricos.

Os dados de base (pré-descarga de efluentes) e várias áreas de referência podem auxiliar na interpretação dos dados. É possível a utilização de dados históricos como uma comparação da linha de base para determinar os efeitos, mas devem ser tratados como dados adicionais para os dados do empreendimento.

O projeto do empreendimento deve incluir tanto uma área de referência quanto uma área de exposição (ou seguir um *design* de gradiente). Isso garante que as condições de referência não mudaram e que as mudanças observadas não estão incorretamente atribuídas ao empreendimento,

porque podem haver alterações nos parâmetros relacionados a mudanças nas condições ambientais (por exemplo, devido a inundações ou variabilidade das temperaturas anuais).

Os empreendimentos são incentivados a realizar estudos da comunidade de invertebrados bentônicos e o monitoramento de peixes de forma concomitante. Onde houver mais de um empreendimento em estreita proximidade onde efluentes são descarregados na mesma bacia de drenagem, deve-se incentivar um MEA conjunto. Nesse caso, as áreas de amostragem podem ser compartilhadas.

Dados ambientais e biológicos obtidos de áreas de referência e de exposição, quando comparados, podem indicar comprometimento da vida aquática (YODER, 1991), diagnosticar estressores (HUGHES *et al.*, 1994), fornecer dados sobre tendências temporais e espaciais (YODER, 1989) e fornecer dados importantes para manejo de recursos hídricos às agências governamentais (OEPA, 1990).

Normalmente empreendimentos costeiros não têm áreas estritamente a montante para referência de amostragem por causa da direcionalidade variável de corrente devido a efeitos de maré.

Empreendimentos estuarinos podem ter zonas a montante que são muito diferentes, fisica e biologicamente para serem adequados para amostragem de dados de referência. A área de referência pode ser, pelo menos periodicamente, a jusante da descarga de efluentes.

É importante compreender os padrões das correntes na área a fim de determinar se uma área de referência potencial está ou não livre da exposição de efluentes do empreendimento.

Na seleção de áreas de amostragem, o empreendimento deve levar em consideração:

- A localização da área de amostragem em pesquisas anteriores;
- A presença ou localização das fontes de confundimento;
- O tamanho da área necessária para acomodar o número de amostras necessárias para ser recolhidas;
- Tipo de *habitat*;
- Acesso ao local;
- Outras questões que poderiam afetar a mobilidade dos peixes.

Em geral, as áreas de amostragem de referência devem ser:

- O mais parecido possível com exceção da exposição aos efluentes. Embora os dois domínios não sejam idênticos, presume-se que as diferenças nas características naturais (por exemplo, a profundidade, o substrato, a vazão e a qualidade da água) sejam pequenas em relação ao efeito associado a presença de efluentes;
- Situadas tão perto quanto possível umas das outras (mas suficientemente distantes para garantir que os peixes da área de referência não estão expostos ao efluente).

O uso de várias áreas de referência oferece o maior poder estatístico para detectar diferenças significativas entre uma área de referência e uma área de exposição (FORAN; FERENC, 1999). Isto também pode dar uma indicação da variabilidade entre as áreas de referência (MUNKITTRICK *et al.*, 2000).

As diferenças encontradas na área de exposição que estão fora da gama de valores observados para um certo número de áreas de referência podem indicar, com maior probabilidade, mudanças ecologicamente relevantes (MUNKITTRICK *et al.*, 2000).

A amostragem de múltiplas áreas de referência é preferível ao aumento do tamanho da amostra (por exemplo, número de peixes) em uma única área (WALKER *et al.*, 2003).

3.5.5 Relatórios de Coordenadas dos Pontos Amostrais

Deve ser registrada a posição no espaço de todos os pontos de amostragem utilizando latitude e a longitude (em graus, minutos e segundos ou em coordenadas UTM). É necessário definir o *Datum* em uso. Recomenda-se o uso do Sirgas 2000.

3.5.6 Fatores de Confundimento

Fatores de confundimento podem alterar a interpretação dos resultados do monitoramento biológico. Se as áreas de amostragem são bastante semelhantes, esses efeitos podem ser considerados negligenciáveis. No entanto, quando há diferenças significativas entre as áreas de amostragem, o MEA pode perder precisão e poder interpretativo.

A instalação de vários pontos de amostragem de referência no MEA pode reduzir fatores de confusão espaciais. Considerações de *design* para a detecção de perturbações antrópicas têm sido apresentados na literatura (ver GREEN, 1993 e referências citadas; UNDERWOOD, 1994 e 1997) e os profissionais são incentivados a incorporar estas considerações em seus delineamentos de estudo.

Alguns exemplos de potenciais fatores de confusão incluem:

- Afluentes e outras fontes de descargas pontuais e não-pontuais (por exemplo, outras descargas industriais, resíduos agrícolas, instalações de aquicultura e estações de tratamento de esgoto);
- Variação ambiental natural/*habitats* variáveis;
- Danos históricos.

Parece básico demais, porém é importante frisar que tudo o que foi discutido neste capítulo deve ser levado em consideração antes do início do programa de monitoramento de efeitos ambientais. O sucesso de um MEA recai fortemente no quão bem elaborado tiver sido seu processo de delineamento experimental.

Uma vez tendo garantido um delineamento robusto, o leitor poderá acompanhar nos capítulos seguintes os principais métodos de amostragem para os diferentes grupos, assim como discussões sobre definição do tamanho da amostra necessária para o monitoramento dos mesmos.

4 Efeitos nos peixes e nos recursos pesqueiros

Thiago Holanda Basilio
Marcelo Paes Gomes
Priscylla da Mata Pavione
Claudio Dalle Olle
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick
Mark Ervin McMaster

4.1 Considerações Gerais p95

4.2 Delineamento Experimental p96
- 4.2.1 Amostragem em Áreas de Exposição e de Referência p97
- 4.2.2 Fatores que Podem Dificultar a Interpretação dos Resultados p97
- 4.2.3 Ambientes Marinhos e Estuarinos p98

4.3 Seleção das Espécies Indicadoras p99
- 4.3.1 Métodos de Amostragem de Peixes p104
- 4.3.2 Fauna Acompanhante p105
- 4.3.3 Métodos Alternativos p105
- 4.3.4 Garantia de Qualidade e Controle de Qualidade da Pesquisa com Peixes p105
  - 4.3.4.1 *Controle de Qualidade no Campo* p106
  - 4.3.4.2 *Controle de Qualidade da Amostragem* p107
  - 4.3.4.3 *Controle de Qualidade no Laboratório* p110

4.4 Indicadores de Efeito Biológico p111
- 4.4.1 Influências Ambientais p116
- 4.4.2 Variações Anatômicas ou Fisiológicas a Nível Populacional p116
  - 4.4.2.1 *Sobrevivência* p118
  - 4.4.2.2 *Estocagem de Energia (fator de condição)* p119
  - 4.4.2.3 *Anomalias* p119
  - 4.4.2.4 *Alimentação* p120
  - 4.4.2.5 *Interpretação* p120
- 4.4.3 Efeito Sobre o Pescado p121
- 4.4.4 Verificação de Exposição dos Peixes ao Efluente p121
- 4.4.5 Relevância Estatística p123

4.5 Verificação da Contaminação do Tecido dos Peixes p124
- 4.5.1 Seleção das Espécies p124
- 4.5.2 Coleta das Amostras e Preparação p125
- 4.5.3 Análise dos Dados p127

4.1 Considerações Gerais

A avaliação da ictiofauna para fins de Monitoramento de Efeitos Ambientais (MEA) consiste no diagnóstico da população de peixes e do grau de contaminação do músculo dos peixes visando determinar se o lançamento de efluentes está afetando os peixes e os recursos pesqueiros.

Este tipo de avaliação possibilita conhecer os níveis dos contaminantes, a saúde e a condição dos organismos e do ecossistema, de forma que não somente o interesse ecológico seja contemplado, mas também o interesse da população que consome o recurso pesqueiro.

Do ponto de vista ecológico o monitoramento dos peixes permite inferir sobre a influência dos contaminantes em características populacionais (condições de crescimento, reprodução, alimentação e sobrevivência) ao promover a comparação entre áreas situadas em gradiente de exposição ao contaminante.

Amostras de tecidos biológicos devem ser obtidas ao longo desse gradiente para verificação dos níveis de contaminação química uma vez que podem ser assimilados pelos peixes a partir de sua alimentação, pela superfície da pele ou incorporados pelas brânquias durante a respiração. Além da verificação *in situ*, também devem ser realizados ensaios de toxicidade em condições laboratoriais de forma a conhecer os níveis subletais e letais de cada contaminante presente no efluente e no recurso hídrico. Assim, torna-se viável estimar a entrada desses contaminantes na cadeia trófica e sua transferência para o consumo humano.

Análises sensoriais, como verificação de odor, sabor ou textura do peixe, e avaliação de más-formações e presença de parasitas, também podem ser realizadas para verificar a relação desses indicadores com o lançamento de efluentes de forma complementar às análises mencionadas acima. Sua presença deve ser avaliada pelo aspecto sanitário e também pelo econômico, uma vez que esse pescado perde qualidade, refletindo em menor remuneração pela atividade pesqueira.

4.2 Delineamento Experimental

Toda pesquisa que envolve organismos aquáticos necessita de um bom delineamento amostral para possibilitar maior precisão nas coletas e captura dos organismos desejados. Assim, para avaliar o efeito de um efluente sobre peixes, as seguintes questões devem ser consideradas:

- A existência do efeito ambiental;
- A relação entre o efeito e o efluente;
- O conhecimento da magnitude e extensão do efeito no corpo hídrico receptor;
- O conhecimento da causa do efeito.

O representante da empresa lançadora do efluente e consultores deverão acionar a agência ambiental e certificar sobre a adequação dos métodos de captura das espécies sentinelas e dos equipamentos para amostragem, bem como da validação da área de referência escolhida, por meio do embasamento em dados históricos e do conhecimento local.

Alterações no delineamento experimental do monitoramento da ictiofauna em andamento, como aumento de esforço amostral, mudanças no método de amostragem e equipamentos, na seleção das espécies sentinelas, na seleção de áreas referência e no monitoramento do lançamento do efluente ou o uso de métodos alternativos de monitoramento podem ser indicados quando:

- Os resultados pretéritos indicarem que o poder da análise foi insuficiente devido ao baixo número e variedade de peixes coletados;
- As características das espécies de peixes não foram determinadas ou se existe preocupação quanto ao *status* da população;
- Existe incerteza da exposição da espécie ao efluente;
- As áreas referência são inapropriadas.

A definição das áreas (referência e próxima ao lançamento do efluente) onde o monitoramento será realizado deve considerar o máximo de fatores que possam levar a resultados satisfatórios. Preferencialmente, mais de uma área referência deverá ser usada e estas devem ser localizadas a montante e em *habitats* similares ao ponto a jusante.

Vale ressaltar que a pressão popular por detecção de resultados positivos para os efeitos do efluente pode interferir no delineamento experimental buscando intensificar o esforço de coleta, aumentando o número de pontos amostrais ou as áreas de forma a contemplar influências que não a do efluente em questão, deslocando do objetivo do MEA.

É importante que seja realizado o delineamento experimental de acordo com o lançamento de efluente, o poluente específico, a biologia e a ecologia das espécies indicadoras para que os resultados não se confundam por inserir efeitos causais diferentes, o que leva à perda de poder estatístico de análise e confiabilidade técnica nos resultados.

4.2.1 Amostragem em Áreas de Exposição e de Referência

A área de exposição deve ser selecionada para garantir que o peixe coletado tenha sido exposto ao efluente. As primeiras coletas devem ser realizadas para definir quais espécies estão presentes e sua abundância relativa na área. A área referência pode ser selecionada por possuir as mesmas espécies presentes na área de exposição ao efluente. A amostragem de ambas deve ocorrer com a menor diferença de tempo possível de modo a descartar a variação temporal. A escolha do período de coleta dependerá de fatores como sazonalidade, estágio de desenvolvimento reprodutivo e mudanças sazonais na diluição dos efluentes (BARRETT; MUNKITTRICK, 2010).

Contudo, é fortemente recomendado que toda a amostragem ocorra na mesma semana, principalmente se não se há conhecimento detalhado do ciclo reprodutivo da espécie. A partir do momento que se conhece esta informação, o tempo de amostragem poderá ser ajustado. Se um período mais longo for necessário, recomenda-se que a área referência seja amostrada antes e depois da área de exposição de modo a permitir comparações. Se alguma espécie que conhecidamente ocorria na área de exposição passa ser vista apenas na área de referência, tal fato deve ser considerado um efeito do efluente.

4.2.2 Fatores que Podem Dificultar a Interpretação dos Resultados

Potenciais fatores que possam confundir a interpretação dos resultados existem na maioria das áreas de amostragem como: outras descargas de efluentes, mudanças no *habitat*, chegada de novas contaminações por percolação e chegada de tributários. Em casos de confusão extrema

(vários estressores na área), métodos alternativos devem ser considerados, mas ajustes no desenho amostral podem ajudar a obter dados interpretáveis. Dada a complexidade de certas situações, é recomendável que o máximo de dados possível seja coletado de forma a demonstrar que outras descargas ou contaminantes sejam primariamente responsáveis pelas alterações observadas ou pela ausência destas. Se alterações são vistas e determinadas por influência de fatores que geram essa confusão, o objetivo dos futuros desenhos amostrais devem eliminar suas influências ou dimensionar suas significâncias.

Uma consideração importante é que um impacto na área de exposição pode ser devido a outros fatores além do efluente e informações subsequentes devem se concentrar em como modificar o projeto para isolar os fatores interferentes.

4.2.3 Ambientes Marinhos e Estuarinos

O lançamento de efluentes em ambientes marinhos ou estuarinos podem gerar problemas e fatores de confusão que devem ser considerados quando for desenvolvido o desenho amostral do MEA quando se trata de coletas de peixes tais como:

- Muitas áreas marinhas ou estuarinas são difíceis de amostrar por influência de marés, correntes, altas taxas de vazão ou *habitats* inapropriados, assim uma abordagem alternativa deve ser considerada;
- Podem ocorrer gradientes de correntes, temperatura, salinidade, ondas etc, que podem afetar processos físicos e a disponibilidade de contaminantes, assim como podem gerar consequências sobre mudanças fisiológicas nos organismos;
- A seleção de áreas referência marinhas pode ser mais difícil devido a tantas influências;
- Peixes em diferentes estágios usam diferentes *habitats* em tempos diferentes ao longo de um ano;
- A disponibilidade de espécies pode ser baixa em ambientes marinhos. Em muitas situações, espécies de peixes de pequeno porte e residentes estão disponíveis e devem ser investigadas. Barret *et al.* (2015) avaliaram sete diferentes espécies do Oceano Atlântico. Essas espécies podem possuir desova múltipla ou viviparidade, ou possuir pouca informação disponível. Entretanto, isso não deve restringir ou inibir de considerá-las no desenho amostral, especialmente se forem abundantes. Um MEA possui a premissa de que a ictiofauna deva estar intacta, com as espécies normalmente abundantes presentes. A próxima prioridade é a de que a população de peixes demonstre taxa de crescimento, desenvolvimento reprodutivo e distribuição de idades indistinguível da área referência, não sendo afetada.

Soluções potenciais para tais dificuldades incluem o uso de espécies alternativas de peixes ou bivalves transplantados, ou ainda mesocosmos para diminuir influências externas. Novas fábricas ou plantas instaladas e que tenham informações de dados basais anteriores ao início do lançamento do efluente terão maior facilidade para determinar seu efeito no ambiente receptor com respeito aos fatores de confusão.

4.3 Seleção das Espécies Indicadoras

Recomenda-se, de acordo com o protocolo Canadense de MEA, a seleção de pelo menos duas espécies de peixes ósseos que tenham sido expostas aos efluentes químicos em determinada fase do seu ciclo de vida em qualquer ecossistema aquático que se deseja monitorar, seja ele de água doce, estuarinos ou marinhos.

Sendo assim, para que os peixes possam indicar ou não a presença de um determinado contaminante aquático, eles necessitam preferencialmente, estar sexualmente maduros e pelo menos uma das espécies deve ser bentônica, ou seja, que se alimenta de organismos que estão associados ao substrato, embora existam outros fatores para seleção das espécies bioindicadoras (Tabela 4.1). Em algumas situações (por exemplo, alguns estuários), as espécies de peixes podem não residir na área o ano inteiro e, por isso, espécies diferentes podem ser usadas para responder efeitos diversos, como crescimento e reprodução.

Os conhecimentos dos pescadores locais (Figura 4.1) e de especialistas na área devem ser considerados para a seleção das espécies, bem como para o detalhamento dos artefatos de pesca a serem utilizados em determinados ambientes, para a definição dos locais e dos períodos mais apropriados para lançamento dos mesmos (BEGOSSI, 2008; BASILIO; GARCEZ, 2014).

Tabela 4.1 Fatores biológicos e sociais a serem considerados para seleção das espécies-sentinela.

Fatores Biológicos	Fatores Sociais
Selecionar pelo menos duas espécies; Tamanho pequeno ou pequena variação; Pouco deslocamento; Máximo de ciclo vital no corpo hídrico a ser avaliado; Constância nos pontos de coleta; Abundância de machos e fêmeas no ecossistema em monitoramento; Espécies com maior exposição aos efluentes; Número de espécimes bioindicadoras coletadas ser acima de 20 indivíduos machos e 20 indivíduos fêmeas.	Ser facilmente identificado pela população; Ter interesse econômico e/ou ecológico; Ser conhecido por pescadores e população; Serem autorizadas pelo órgão fiscalizador.

Entretanto, existem algumas regiões em que os ambientes não suportam um número suficiente para amostragem necessária ao estudo. Nesses casos, para satisfazer a quantidade de organismos recomendados e/ou quando não há peixes adequados para o monitoramento, sugere-se que sejam utilizados os seguintes critérios para classificação dos peixes a serem utilizados como bioindicadores:

- Pelo menos uma espécie de peixe sexualmente maduro e outra sexualmente imatura;
- Duas espécies de peixes sexualmente imaturas;
- Apenas uma espécie de peixe sexualmente madura;
- Uma espécie de peixe sexualmente imatura.

De qualquer forma, possíveis alterações na seleção das espécies indicadoras devem ser elaboradas quando as mesmas possuem ciclo de vida longo (acima de 30 anos), quando não é possível medir todos os parâmetros biológicos dos peixes, quando são coletados um número insuficiente de organismos sentinelas (indicadores) ou quando não podem ser utilizados outros métodos seletivos para coleta dos peixes.

No Projeto Peixe Guia foram escolhidas como espécies indicadoras da qualidade dos estuários dos rios Santa Maria da Vitória, Jucu e Benevente, os seguintes peixes: bagre (*Genidens genidens* / Figura 4.2), cangoá (*Ophioscion punctatissimus* / Figura 4.3), amboré (*Bathygobius soporator* / Figura 4.4) e moreia (*Eleotris pisonis* / Figura 4.5) por serem os peixes com maior número de ocorrência nas capturas realizadas em 2013, 2014 e 2015.

Figura 4.1 Definição dos locais de monitoramento da ictiofauna nos estuários dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu, Projeto Peixe Guia, com a colaboração dos pescadores locais, especialistas da área, agência ambiental e empresas.

Figura 4.2 Bagre (*Genidens genidens*), utilizado como bioindicador nos estuários dos rios de Santa Maria, Jucu e Benevente no Projeto Peixe Guia.

Figura 4.3 Cangoá (*Ophioscion punctatissimus)*, utilizado como bioindicador no estuário do Rio Benevente no Projeto Peixe Guia.

Figura 4.4 Moréia *(Eleotris pisonis)*, utilizado como bioindicador no estuário do Rio Santa Maria da Vitória no Projeto Peixe Guia.

Figura 4.5 Amboré (*Bathygobius soporator)*, utilizado como bioindicador no estuário do Rio Santa Maria da Vitória no Projeto Peixe Guia.

4.3.1 Métodos de Amostragem de Peixes

Para realização do estudo é necessário inicialmente preparar o delineamento amostral das coletas nos ambientes que se deseja monitorar. As datas das campanhas devem ser agendadas a partir da definição das estações do ano, fases da lua e de maré, períodos reprodutivos das espécies estudadas e da intensificação da descarga dos efluentes químicos nas regiões de monitoramento.

Pode-se perceber com maior ênfase essas variações em regiões estuarinas que sofrem a influência das marés nas diferentes fases da lua. Nessas regiões é recomendado que as coletas sejam realizadas na lua de quarto crescente e/ou na lua de quarto minguante por conta da baixa amplitude das marés nesses períodos e consequentemente diminuição da força da entrada e saída de água no complexo estuarino, o que pode prejudicar a atuação dos artefatos de pesca e consequentemente a captura dos peixes.

Em todos os casos, a metodologia de amostragem deve ser definida em função das características específicas do local de coleta a ser monitorado, bem como pelos artefatos de pesca que se mostrem adequados ao ambiente de estudo e às características biológicas e ecológicas das espécies sentinelas. Os mesmos métodos de amostragem podem ser usados para pesquisas populacionais e de comunidades de peixes, com a diferença entre eles residindo na seletividade do aparelho de pesca. Durante uma pesquisa de comunidade de peixes, o aparelho de pesca deve ser o menos seletivo e destrutível possível. Para a pesquisa de população, que foca em poucas espécies, o aparelho de pesca deve ser mais seletivo.

Para este tipo de trabalho é de fundamental importância padronizar a amostragem, garantindo que as espécies sentinelas sejam capturadas no mesmo estágio/fase e quantidade que em coletas anteriores, a menos que estas capturas estejam implicando numa quantidade muito grande de fauna acompanhante. A junção de dados de técnicas diferentes de amostragem de peixes deve ser evitada, embora possa haver utilização de mais de um aparelho de pesca ou o mesmo aparelho com características diferentes (Figura 4.6). Testes estatísticos deverão ser conduzidos para avaliar a possibilidade de junção de dados originados de diferentes técnicas.

No projeto Peixe Guia foram utilizados para captura dos peixes redes de espera de emalhe, covo/armadilha de peixe (jiqui) e espinhel em cada ambiente monitorado. Esses artefatos de pesca foram selecionados, pois possibilitam considerável quantidade de peixes definidos como indicadores em cada ambiente aquático. Os artefatos de pesca podem permanecer aproximadamente de 6 a 12 horas na água antes de iniciar o processo de despesca dos peixes a serem destinados para análise. É sugerido o auxílio dos pescadores para possibilitar o maior acerto na captura das espécies alvo. O conhecimento ecológico local é necessário para definição de toda amostragem de coleta em campo.

4.3.2 Fauna Acompanhante

A obtenção de amostras vindo da fauna acompanhante da pesca comercial, experimental ou outra pode ser possível desde que se certifique que os dados sejam devidamente documentados e os procedimentos de amostragem e as condições dos peixes estejam de acordo com as exigências do controle de qualidade utilizados para as espécies sentinelas. Vale comentar que nos estudos de MEA canadenses, os dados de pesca com anzol têm sido usados com sucesso.

Todos os peixes e outros organismos capturados também devem ser analisados para investigação de possíveis avarias e de diferenças nos padrões de cada espécie. No entanto o detalhamento do estudo deve ser realizado apenas com as espécies sentinelas.

4.3.3 Métodos Alternativos

Durante a condução das pesquisas com peixes podem haver situações onde o modelo de coleta definido não seja possível de ser aplicado. Razões para esta dificuldade residem nas características específicas do local e, dentre estas, as mais ocorrentes são condições extremas (por exemplo, correntes fortes) ou presença de fatores modificadores do ambiente como descarga de efluentes, tornando extremamente difícil isolar os peixes dos efeitos associados a estas mudanças no ambiente. Diante dessas situações, pode-se selecionar uma opção alternativa para a coleta dos peixes.

4.3.4 Garantia de Qualidade e Controle de Qualidade da Pesquisa com Peixes

A qualidade dos dados coletados em campo influencia a análise e a interpretação dos dados. O preparo prévio das planilhas para coleta de dados irá economizar tempo no campo e possíveis erros no registro das informações. Condições ambientais, características do *habitat*, aparelho de pesca utilizado e Cálculos da Captura pela Unidade de Esforço (Cpue) devem ser registrados nos dias coleta. O uso dos mesmos equipamentos (balança, trena, paquímetro, disco de sechii, sonda multiparâmetro etc.) durante todo o estudo e equipe treinada irá contribuir para diminuir erros de medidas.

Figura 4.6 Pescador e estudante auxiliando nas atividades de coleta de peixes com redes de espera no estuário do Rio Benevente, localizado no município de Anchieta - ES. Projeto Peixe Guia.

4.3.4.1 Controle de Qualidade no Campo

Este é o primeiro nível da coleta de dados e deve ter os procedimentos listados previamente no plano de estudo da pesquisa com intuito de garantir alto controle de qualidade no campo. Desta forma, muitos componentes devem ser verificados antes da amostragem de campo tais como:

- Iniciar e manter uma relação e comunicação com estâncias de governo estaduais e federais garantindo o amparo legal da coleta (licença de pesca e da coleta de material biológico no Sistema de Autorizações e Informação em Biodiversidade – Sisbio, licença de coleta no Ministério da Pesca e de Secretarias de Pesca, autorizações com colônias de pescadores etc.);
- Todo o pessoal de campo deve ter o treinamento adequado e estar familiarizado com o padrão de registro dos dados da pesquisa;
- Todas medidas de segurança devem ser identificadas, entendidas e utilizadas;
- Métodos de coleta de peixes e equipamentos devem ser apropriados para os corpos de água e espécies de peixe;
- Descrições do *habitat*, incluindo possíveis agentes modificadores (profundidade e corrente, oxigênio dissolvido, temperatura, tipo de substrato, indícios de poluição, cor da água, odor, resíduos, salinidade, condutividade etc.);
- Data e hora da coleta;
- Métodos de coleta devem ser consistentes durante o período de estudo;
- Área de amostragem e área de coleta dos peixes devem ser documentadas (coordenadas geográficas) e fotografadas;
- Registro da diversidade de peixes e fauna acompanhante por ponto de coleta;
- Cálculo da captura por unidade de esforço (Cpue);
- Amostras biológicas dos peixes (por exemplo, ovários, otólitos, estômagos) devem ser acondicionadas em recipiente adequado e imediatamente analisados como bioindicadores;
- Preservação e fixação adequada de amostras;
- Etiquetação adequada nos peixes coletados em cada ponto de coleta;
- Utilização adequada de equipamentos que garantam precisão e acurácia para aferir peso e medidas;
- Equipamentos devem ser calibrados e mantidos guardados de forma correta;
- Anotações de campo detalhadas devem ser mantidas num bloco de notas;
- Devem ser usados cadeias de custódia e procedimentos de transporte e armazenamento adequados;
- Os dados coletados devem ser transferidos para o computador imediatamente para o início das análises estatísticas.

4.3.4.2 Controle de Qualidade da Amostragem

Para a determinação de um nível de esforço de pesca razoável devem ser seguidos critérios baseados na efetividade dos aparelhos de pesca, considerando todas as informações disponíveis sobre a espécie, sobre os artefatos de pesca e sobre o ambiente (Figura 4.7).

O delineamento amostral deve documentar todos os detalhes de como a amostragem dos peixes adultos será realizada. Para auxiliar na avaliação do correto esforço devem ser levadas em consideração as seguintes informações:

- Como e por que as espécies sentinelas foram escolhidas;
- Planos de contingência com artes de pesca e espécies sentinelas alternativas;
- Tipo e tamanho de malha, de anzol e da abertura do jiqui;
- Quem foi consultado sobre os locais e técnicas escolhidas para coletar as espécies sentinelas propostas;
- Duração da amostragem (*i.e.*, intervalo entre lançamento e recolhimento da arte de pesca);
- Período de amostragem (*i.e.*, período do dia, quais meses);
- Esforço de pesca sugerido;
- Tipo, locais e dimensões dos artefatos de pesca;
- Frequência de checagem.

Qualquer resultado preliminar de amostragens piloto deve ser levada em conta na elaboração do plano de amostragem, guiando a seleção das espécies sentinela e/ou procedimentos de amostragem. Os responsáveis pelo monitoramento, gestores públicos, empresas envolvidas no lançamento de resíduos ao corpo hídrico, pescadores, comunidades em geral deverão revisar os dados e requisitar informações adicionais para esclarecer procedimentos de amostragem.

Procedimentos operacionais adequados devem ser utilizados, o que inclui utilização dos padrões estabelecidos de artes de pesca contidas no plano de estudo. Artefatos de pesca recolhidos numa frequência que garanta a recuperação das espécies sentinelas em condições adequadas e devolução da fauna acompanhante (especialmente espécies ameaçadas). O uso de técnicas seletivas e/ou não letais devem ser considerados. Os responsáveis devem ter um bom entendimento do *habitat*, características das espécies e do artefato de pesca a ser considerada.

Não se pode permitir que os peixes indicadores permaneçam por um longo período fixados aos artefatos de pesca no ambiente aquático, pois poderá intensificar a ação de predadores e para que os peixes não percam suas características fisiológicas e organolépticas (textura, cor, sabor e odor) mais rapidamente e antes das análises.

Quando o peixe estiver lesionado deve-se apenas proceder com a identificação da espécie, registro do comprimento e do peso, quando possível e informações dos locais e tipos de lesão.

No Projeto Peixe Guia, realizado no Espirito Santo, nos Estuários dos rios Benevente, em Anchieta, Santa Maria da Vitória, em Vitória e Jucu, em Vila Velha, foram utilizados como artefatos de pesca, o jiqui e

Figura 4.7 Padronização dos artefatos de pesca.

redes de espera de emalhar que permaneceram de 6 a 12 horas na água para que os peixes não estivessem deteriorados. O esforço amostral foi definido a partir das características de cada ambiente monitorado e das informações oferecidas pelos pescadores locais.

Alguns estuários, tais como o do Rio Benevente e do Rio Santa Maria da Vitória, sofrem influência da maré e, por isso, as coletas ocorreram nas luas de quarto crescente e/ou quarto minguante. Após as coletas dos peixes, os mesmos foram encaminhados para os laboratórios parceiros do projeto e analisados (Figura 4.8).

4.3.4.3 Controle de Qualidade no Laboratório

Os peixes coletados devem ser encaminhados frescos para o laboratório para diminuir o erro e aumentar a confiabilidade dos seus resultados. Devem ser utilizados equipamentos como ictiômetros, balanças de precisão (Figura 4.9) e microscópios para registro de características individuais de cada peixe. Para identificação de espécies estuarinas recomenda-se as seguintes literaturas: Figueiredo (1977); Figueiredo e Menezes (1978, 1980, 2000); Menezes e Figueiredo (1985) e Araújo, Teixeira e Oliveira (2004).

No laboratório é desejável que os peixes sejam analisados por equipe multidisciplinar para aumentar a capacidade de uma análise mais profunda dos peixes que foram coletados em determinados ambientes monitorados. Recomenda-se o cuidado com os seguintes procedimentos para registro das informações necessárias ao biomonitoramento, tais como:

- Comprimento total, comprimento padrão e comprimento furcal dos peixes;
- Peso total do peixe;
- Coloração geral do organismo e das brânquias;
- Presença e coloração dos olhos;
- Presenças de manchas e de marcas no corpo;
- Presença de feridas e /ou parasitas;
- Situação geral do peixe (se está completo ou se está lesionado em alguma estrutura corporal);
- Foto dos peixes e de suas estruturas;
- Coleta de tecido para análise de contaminação de metais pesados e de outros compostos químicos;
- Retirada dos órgãos responsáveis pela alimentação (estômago e intestino);
- Peso do estômago cheio, peso do estômago vazio, quantificação dos resíduos alimentares e identificação dos itens alimentares;
- Peso das gônadas e estágio da maturação;
- Peso do fígado;
- Definição do sexo, por meio da visualização e coloração das gônadas (brancas em machos e avermelhadas e vascularizadas em fêmeas);
- Contagem dos ovos e definição de cor e textura;
- Tamanho dos ovos;
- Condições visuais internas e externas dos peixes e dos órgãos.

Essas informações são importantes, pois compõem um banco de dados ecológicos, ambientais e biológicos dos ambientes e dos peixes indicadores a serem monitorados. Todas as informações devem ser analisadas de maneira integrada com os demais resultados do monitoramento para que se possa extrair ao máximo a condição ambiental por meio das observações dos peixes indicadores.

4.4 Indicadores de Efeito Biológico

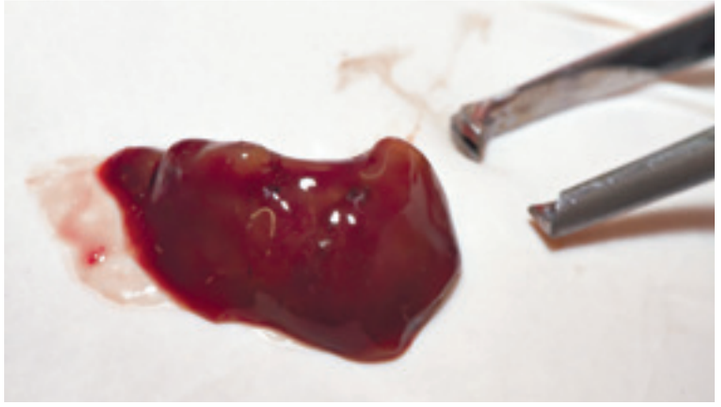
A verificação dos efeitos de um efluente específico deve respeitar: Ⓐ as influências ambientais sobre as populações das espécies de peixes sentinela, Ⓑ as variações anatômicas ou fisiológicas a nível populacional e Ⓒ o efeito sobre o pescado.

O programa de MEA foca em parâmetros mensuráveis em nível de indivíduos por diversas razões:

- Essa abordagem se relaciona com a sensibilidade dos peixes aos efeitos do efluente e com sua reversibilidade em nível bioquímico, bem como sua relevância em termos de parâmetros em nível de comunidade biológica;
- O monitoramento em nível de comunidade irá perder efeitos importantes e reversíveis em nível populacional;
- Mudanças nos peixes em termos de crescimento, condição, reprodução e sobrevivência os coloca em risco, então análises focadas na população de peixes levam a contribuir com a proteção dos recursos pesqueiros;
- Conhecer o grau desse risco se torna importante ferramenta para o manejo do ecossistema.

A

B

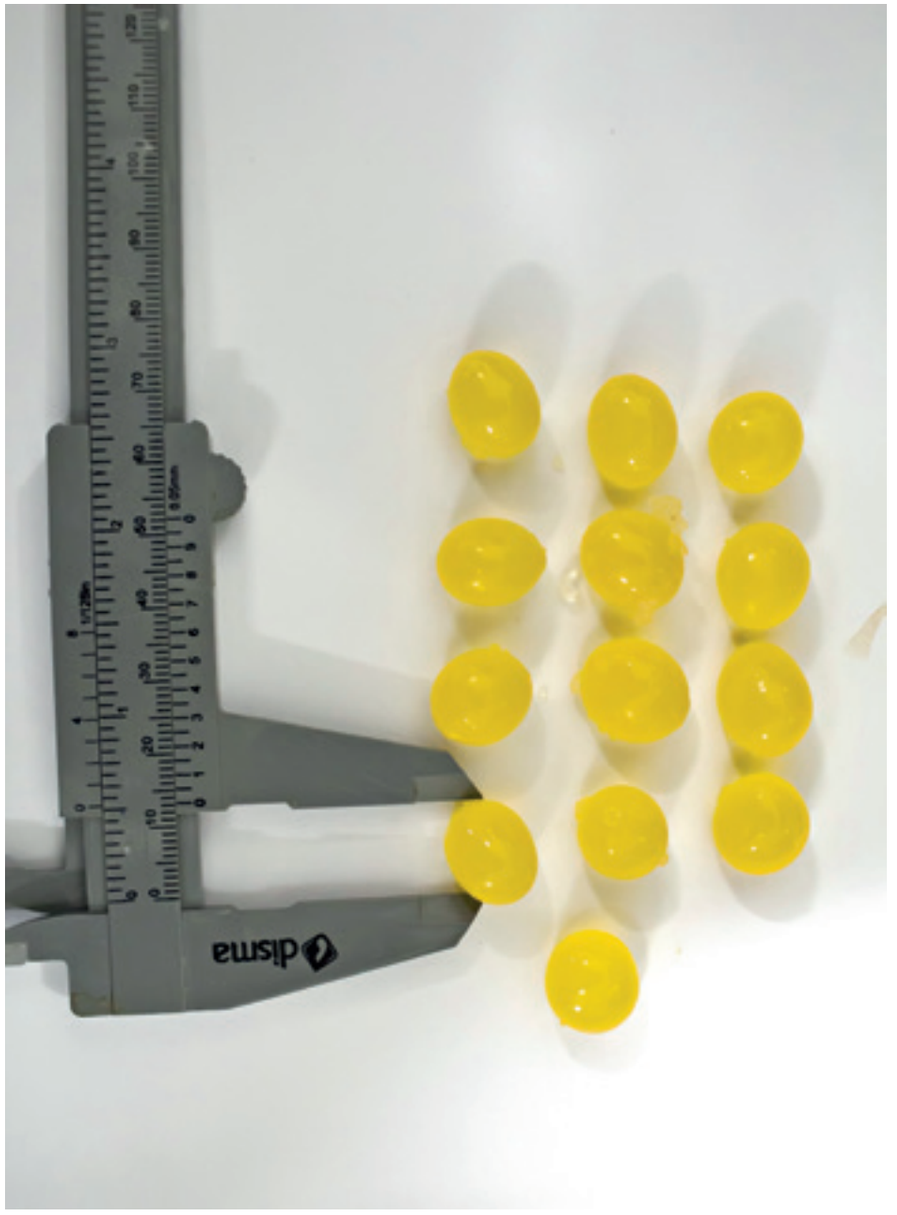


C

D

Figura 4.8 Procedimento em laboratório para retirada dos orgãos dos peixes. Ⓐ Retirada de tecidos, Ⓑ Gônada da fêmea de cangoá, Ⓒ Fígado, Ⓓ Gônada de fêmea de bagre.

A



B

Figura 4.9 Ⓐ Pesagem das gônadas e Ⓑ medição dos ovócitos.

4.4.1 Influências Ambientais

É conhecido que as populações de peixes respondem às influências impostas pelo ambiente como a sazonalidade dos períodos de chuva e seca, o fotoperíodo, a concentração de sólidos suspensos na água, entre outros.

As populações de peixes apresentam flutuação natural entre anos diferentes. Eventos reprodutivos e de alimentação produzem efeitos sobre seu deslocamento ao longo das áreas definidas para o monitoramento. Estes são diretamente influenciados pela sazonalidade na medida em que estão relacionados à disponibilidade de alimento/abrigo e à estabilização de variáveis ambientais que os desencadeiam.

A eficiência dos artefatos de pesca também é influenciada pela sazonalidade. As redes de emalhe, por exemplo, tem sua eficiência diretamente relacionada pelo aumento de turbidez da água, comum em períodos de chuvas mais intensas. Já a pesca com anzol, por linha ou espinhel, tem seu sucesso aumentado com correntezas de baixa intensidade, pois expõe melhor o anzol e desgasta menos a isca.

Por outro lado, o efluente também pode ter suas características alteradas pela sazonalidade. A entrada de água por chuvas ou correntes pode provocar diluição do mesmo ou aumentar sua adsorção pelos sólidos na água. O aumento de salinidade pode aumentar sua complexação com o sedimento.

4.4.2 Variações Anatômicas ou Fisiológicas a Nível Populacional

Para responder à questão "o peixe foi modificado pelo efluente?" efeitos sobre o crescimento, reprodução, condição e sobrevivência devem ser examinados. O programa de MEA sugere que as coletas de peixes sejam eficazes para gerar indicadores chave medidos em machos e fêmeas adultos de duas espécies de peixes de forma a obter estimativas sobre distribuições de idade ou tamanho, o quanto o peixe está hígido ao utilizar sua energia para reprodução e crescimento e o quanto é capaz de produzir reservas energéticas.

O número de amostras necessárias para manter o poder estatístico de análises pode ser calculado a partir Ⓐ do desvio padrão do tamanho da gônada em termos de espécie e local e Ⓑ do efeito de tamanho crítico de 25%. Se não há dados disponíveis para tal estimativa, recomenda-se iniciar o monitoramento de forma a obter no mínimo 20 indivíduos maduros sexualmente por gênero de duas espécies candidatas a sentinelas por área. Alterações podem ser realizadas após a determinação de dados basais confiáveis.

O delineamento experimental deve considerar o tamanho amostral adequado para o monitoramento. Dados pretéritos são altamente desejáveis para a construção das estimativas. Coletas de peixes são mais eficientes quando se diminui a variabilidade dos resultados. Quando a variabilidade é tão alta a ponto de não ser justificável ou dispendiosa demais a coleta, o delineamento experimental deve ser modificado para Ⓐ reduzir a variabilidade, Ⓑ selecionar nova espécie sentinela com menor variabilidade ou Ⓒ considerar métodos alternativos.

É fortemente recomendado que se processe as amostras de peixes (entenda-se por realizar triagem, identificação, biometria, sexagem, análise de órgãos internos e extração de amostras de tecido para análise histológica, toxicológica, de alimentação e de reprodução) imediatamente após a coleta. Além de garantir a qualidade das amostras, o acompanhamento da razão sexual (buscando 1:1) determinará o esforço de coleta a ser despendido por área de monitoramento.

Peixes que estejam em estádio sexual imaturo (sem desenvolvimento para entrar em reprodução) devem ser excluídos das análises estatísticas. O desenvolvimento gonadal não uniforme ocorre em situações em que Ⓐ a desova múltipla ocorre dessincronizada, Ⓑ desova múltipla é influenciada em número por tamanho ou idade dos reprodutores e Ⓒ os peixes não conseguem acumular energia necessária para desencadear evento reprodutivo. Em qualquer caso, as análises devem ser conduzidas em grupos categorizados como "peixes desenvolvidos para reprodução" e "peixes não desenvolvidos para reprodução". Embora os grupos não devam ser comparados entre si, as proporções entre eles devem ser consideradas como indicadores. Com uma base representativa de dados pretéritos, mais grupos podem ser estabelecidos, baseados em critérios de tamanho ou condição, trazendo maior sensibilidade para o monitoramento.

O monitoramento opera em um modelo interativo e em ciclos, não sendo necessário deflagrar um levantamento completo da população de peixes em uma única coleta e as medições são planejadas para dar suporte no desenvolvimento de uma avaliação por mais de um ciclo. Qualquer efeito verificado no levantamento dos peixes precisa da confirmação gerada pelo próximo ciclo. As medições listadas na Tabela 4.2 são as requisitadas, mas indicadores alternativos podem ser necessários para situações específicas relativas à área ou espécie de peixe.

Tabela 4.2 Medições requisitadas em estudos de levantamentos de peixes para MEA, suas precisões específicas e resultados que devem ser gerados.

Medições	Precisão esperada	Resultado gerado por área
Tamanho (furcal ou padrão ou total)	± 1mm	Média, DP, EP, mínimo e máximo
Peso úmido total (fresco)	± 1,0%	Média, DP, EP, mínimo e máximo
Idade	± 1 ano (10% para confirmação independente)	Média, DP, EP, mínimo e máximo
Peso gonadal (de peixes maduros)	± 0,1g para peixes médios e grandes, 0,001g para peixes pequenos	Média, DP, EP, mínimo e máximo
Tamanho do ovo (de peixes maduros)	± 0,001g	Peso (recomenda-se sub-amostragem mínima de 100 ovos), Média, DP, EP, mínimo e máximo
Fecundidade[1]	± 1,0%	Número total de ovos por fêmea, Média, DP, EP, mínimo e máximo
Peso de fígado ou hepatopâncreas	± 0,1g para peixes médios e grandes, 0,001g para peixes pequenos	Média, DP, EP, mínimo e máximo
Anomalias	Qualitativo	Presença de lesões, tumores, parasitas e outros
Gênero	Qualitativo	-

1. Pode ser calculado dividindo o peso total do ovário pelo peso individual de lotes de não menos que 100 ovos (dependendo da espécie, como ovos grandes, os lotes podem ter menos ovos)

4.4.2.1 Sobrevivência

A média etária se destina a dar uma avaliação de idades relativas das populações do ponto referência e do ponto próximo ao efluente. Em se padronizando uma arte de pesca que selecione por tamanho, como rede de emalhe, e em verificando diferenças de idade entre as áreas, é um indicativo de que há necessidade de maiores investigações sobre essas populações no ciclo subsequente. Informações mais detalhadas podem ser obtidas a partir de distribuições de idade ou tamanho (caso a idade não seja possível) desde que tamanhos amostrais adequados sejam disponibilizados. Ao contemplar peixes com tempo de vida curtos (< 4 anos) como espécies sentinela torna-se necessário inserir os imaturos e juvenis na avaliação apropriada de efeito do efluente. É difícil obter diferenças de 25% em idade em espécies com tempo de vida curtos, por isso podem ser consideradas diferenças de 25% em comprimento em seu lugar. Na Tabela 4.3 são apresentadas estruturas apropriadas para determinação de idade de prováveis espécies sentinela no Brasil.

Tabela 4.3 Estruturas sugeridas para análise de determinação de idade em peixes brasileiros.

Estrutura	Família (nome comum de representantes)	Comentários
Espinho dorsal	*Squalidae* (Tubarão de espinho)	
Otólitos	*Atherinidae* (Peixe-rei); *Batrachoididae* (Peixe-sapo); *Carangidae* (Xaréu); *Clupeidae* (Sardinha); *Haemulidae* (Corcoroca)	
Otólitos, raios	*Scombridae* (Bonito)	
Otólitos, raios peitorais, escamas	*Cyprinidae* (Carpa); *Salmonidae* (Dourado); *Sciaenidae* (Cangoá)	Otólitos para *Cyprinidae* e *Sciaenidae*
Otólitos, escamas	*Bothidae* (Linguado; *Pleuronectidae* (Linguado)	
Espinho peitoral	*Ariidae* (Bagre)	
Escamas	*Cichlidae* (Lambari); *Cyprinodontidae* (Guppie); *Mugilidae* (Tainha); *Serranidae* (Badejo); *Sparidae* (Pargo)	Precisa de Raios para indivíduos com idade avançada
Vértebra, raios	*Lophidae* (Peixe-pescador)	
Medula vertebral	*Rajidae* (Raias)	

4.4.2.2 Estocagem de Energia (fator de condição)

Avaliação de reservas energéticas proporcionam informações valiosas quanto à disponibilidade e à qualidade do alimento para o peixe. O programa de MEA usa o fator de condição (relações comprimento/peso corporais) e o tamanho do fígado como indicadores de reserva energética. Assim como outros indicadores, a consistência em resposta entre indicadores é importante. O tamanho do fígado pode aumentar por vários motivos, entre eles a estocagem de lipídeos e glicogênio e o aprimoramento da atividade de desintoxicação.

4.4.2.3 Anomalias

Anomalias externas, como lesões em tegumento, nadadeiras, olhos, ou internas, como tumores, má formação, hemorragias, parasitas, são indicadores de possível efeito do efluente quando frequentes dentro da população exposta. As anomalias devem ser registradas em fotografias em campo ou durante a triagem em laboratório.

4.4.2.4 Alimentação

Para verificar os efeitos sobre a alimentação da população devem ser considerados:

- Peso do conteúdo estomacal em relação ao peso corporal;
- Variedade de itens do conteúdo estomacal;
- O grau de repleção do estômago em relação ao alimento (sugere-se utilizar os parâmetros de 0, 25, 50 75 e 100% do volume estomacal preenchido como suas categorias);
- O grau de digestão dos itens alimentares (sugere-se "Digerido", "Parcialmente digerido" e "Não digerido" como suas categorias);
- A abundância numérica de cada item alimentar;
- A proporção em peso úmido de cada item alimentar;
- A preferência pelo item alimentar pelo diagrama de Amundsen (AMUNDSEN; GABLER; STALDVIK, 1996).

4.4.2.5 Interpretação

Os dados sobre alimentação e reprodução devem ser relacionados à abundância e tamanho das espécies sentinelas para verificação de diferenças entre cada área amostrada. O tamanho dos peixes deve ser relacionado com os índices Hepatossomático (IHS = peso do fígado/peso do corpo x 100) e Gonadossomático (IGS = peso das gônadas/peso do corpo x 100). O IHS tende a acompanhar a condição corporal, enquanto o IGS tende a aumentar com a chegada do período reprodutivo. Variações desses parâmetros podem estar relacionadas com os efeitos subletais do efluente e indicar a necessidade de análises mais refinadas sobre sua concentração (e/ou de seus componentes) nos organismos, de ensaios ecotoxicológicos e de determinação de concentrações de contaminantes no ecossistema (BARRET *et al.*, 2015).

O fator de condição (K) é um índice utilizado em estudos de biologia pesqueira, pois indica o grau de bem-estar do peixe frente ao meio em que vive e deve permanecer constante, independentemente do tamanho que o peixe possa vir a ter (BRAGA, 1986) e seu uso informa alterações de bem estar das populações de peixes ao longo de um determinado período (GOMIERO; BRAGA, 2003). O Fator de Condição Total (K) é calculado pelo método alométrico a partir da expressão $K=10^5$ W/Lb, na qual (W) representa a massa total e (L) o comprimento padrão dos indivíduos. Entende-se que valores de b superiores a 3,0 refletem um crescimento alométrico baseado no ganho de biomassa, enquanto b = 3,0 dizem respeito a um crescimento isométrico (ZAVALA-CAMIN, 1996; WOTOON, 1998; LIZAMA; AMBRÓSIO, 1999).

O efluente pode ainda ter efeito sobre os demais níveis tróficos aos quais as espécies sentinela estejam relacionadas, podendo afetar a disponibilidade e a variedade de alimento. As análises de conteúdo alimentar e de levantamento de bentos podem ajudar a explicar variações dos níveis de IHS e IGS e indicar susceptibilidades aos efeitos do efluente além das espécies sentinela.

4.4.3 Efeito Sobre o Pescado

Variações sobre a abundância e o crescimento dos peixes trazem reflexos diretos sobre o rendimento e a sustentabilidade da atividade pesqueira. Invariavelmente observa-se que, com a queda de qualidade do pescado aumenta-se o esforço de pesca e o custo da atividade pesqueira. Somado ao efeito de um contaminante, que pode ser transferido ao consumidor, tem-se um cenário crescente de privação da atividade pesqueira.

Com o monitoramento devidamente implementado, os pescadores e a população de consumidores de pescado se tornam um grupo avaliador imprescindível por ser a primeira instância de detecção de efeitos sobre o pescado. A observação de problemas com a pesca da espécie sentinela em termos de esforço, abundância e comercialização é um alerta para iniciar um ciclo de monitoramento.

A determinação de uma base de dados que demonstrem um padrão normal para referência da população se torna uma importante ferramenta para o monitoramento. O estabelecimento de indicadores de qualidade do pescado, como tamanho mínimo de captura e acompanhamento de dados históricos de desembarque pesqueiro, compõem um método sensível a variações naturais ou induzidas por contaminantes.

4.4.4 Verificação de Exposição dos Peixes ao Efluente

É crucial que esses estudos sejam delineados para maximizar a detecção dos efeitos caso eles se apresentem. Tal meta pode ser atendida com a devida adequação de período de amostragem, arte de pesca, áreas de amostragem e permanência do efluente. Diante de incertezas sobre a exposição ao efluente, modificações no delineamento amostral ou métodos alternativos devem ser considerados.

Controvérsias podem surgir caso não sejam observadas diferenças de características populacionais entre as áreas. Marcadores químicos nos tecidos podem ser utilizados para confirmar a incorporação de componentes do efluente na área de exposição, dependendo de sua natureza e de seu processamento prévio ao lançamento.

Diferenças estatisticamente significativas entre áreas e entre as características das populações de cada área dão confiança à análise. A falta dessas diferenças pode indicar que há movimento das populações ou que não há impacto do efluente. Marcadores biológicos, como isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, podem demonstrar a residência das populações nas áreas. Outros marcadores biológicos podem ser empregados para esse fim.

Período de coleta e hábitos das espécies sentinela podem aumentar a probabilidade de exposição ao efluente. Por exemplo, períodos de seca podem aumentar a concentração do efluente na água e facilitar sua absorção, enquanto migrações para fora da área de exposição ao efluente podem gerar o efeito inverso. Dados pretéritos podem facilitar a determinação desses períodos, ao passo que o monitoramento proporciona o início dessa análise caso não haja informação disponível.

As coletas devem tentar contemplar períodos em que o efluente seja lançado de acordo com o funcionamento normal do empreendimento. Amostragens em períodos de longa ausência do efluente devem ser evitadas, mas devem seguir as condições mais apropriadas para a coleta, considerando o funcionamento da arte de pesca e a hidrologia local.

Baixas capturas, especialmente na área exposta ao efluente, podem ser consideradas como resultados e demonstram que os peixes estão evitando essa área. A adequação das espécies sentinela deve ser considerada ao fim do ciclo com base em sua residência e exposição na área-específica.

Em algumas situações, os peixes se movem naturalmente entrando e saindo da área exposta ao efluente e nenhuma espécie passa períodos de tempo no efluente. Nesse caso, a amostragem deve ser desenhada para maximizar a exposição ao efluente e de preferência nos períodos de ótimo desenvolvimento gonadal.

Existem duas questões relevantes com relação a residência dos peixes: se o peixe do ponto referência e da área de exposição estão misturandos; e se os peixes capturados na área do efluente de fato foram expostos ao mesmo. Se o peixe foi coletado na área do efluentes e apresenta características diferentes dos peixes da área referência, então não há

controvérsias. Se os peixes coletados na área do efluente não apresentam diferenças dos peixes da área referência por dois ciclos de monitoramento, conclui-se que as efluentes não estão afetando os peixes, considerando o atual desenho amostral e, as respostas biológicas analisadas.

4.4.5 Relevância Estatística

O objetivo de definir o tamanho do efeito e a relevância estatística é determinar se o delineamento amostral provém informação suficiente para decisões a serem tomadas. A leitura estatística considera o tamanho amostral, a variabilidade e as diferenças entre as áreas.

É recomendável que o delineamento amostral ajude a garantir alta probabilidade de detecção estatística do tamanho do efeito pré-determinado (isto é, o poder do teste $(1-\beta)$ em 0,8 e alfa (α) em 0,05). Cada parâmetro possui sua variabilidade, trazendo variações para a determinação da relevância dos dados estatísticos. Se o efeito no tamanho dos peixes expresso por uma escala relativa (%), um estudo que seja sensível a diferenças de ± 25% em tamanho de gônadas pode detectar diferenças similares ou menores em outros parâmetros importantes.

Recomenda-se que o programa de MEA seja desenhado para detectar diferenças de 20 - 30% no tamanho das gônadas usando um nível de poder estatístico recomendado de 0,90 $(1-\beta)$. A magnitude da diferença que pode ser detectada para outros parâmetros seria fixada com base no tamanho da amostra para a determinação de um efeito sobre o tamanho das gônadas. O grau de abrangência do modelo estatístico para detectar diferenças nos demais parâmetros deve ser revisto durante o estudo para garantir que ele permita a inclusão de tantas variáveis quanto possível. A mesma abordagem usada para identificar um efeito de tamanho alvo para o peso relativo das gônadas deve ser aplicada a outras variáveis. A análise de sensibilidade usando modelos populacionais deve ser usada para explorar as consequências do efeito de tamanho escolhido para todas as variáveis.

Quando as análises preliminares mostrarem que a abrangência do modelo estatístico é insuficiente, dado a tamanhos amostrais, o delineamento amostral deve ser revisto. Estudos são projetados de forma local-específica, e deve ser dada prioridade à redução da variabilidade em vez de aumentar o tamanho da amostra. Como a variabilidade também irá variar entre campanhas de amostragem, o efeito de tamanho desejado não deve ser um número fixo, mas sim deve ser uma série de mudanças que se deseja detectar tais, como 20-30% de diferença.

4.5 Verificação da Contaminação do Tecido dos Peixes

Os estudos para detectar a concentração de metais pesados, dioxinas, furanos e outros compostos bioacumuláveis nos tecidos dos peixes são recomentados quando estes contaminantes são detectados na água e/ou no sedimento ou quando a aparência, sabor ou odor dos peixes são alteradas (ENVIRONMENT CANADA, 2010 e 2012).

Nos casos em que os peixes, dos diferentes pontos amostrais, não apresentarem diferenças significativas quanto aos índices de condição biológica, estudos de bioacumulação também poderão ser utilizados como marcadores da exposição do peixe ao efluente.

Os tecidos dos peixes a serem analisados variam de acordo com o tipo de efluente a ser avaliado e tempos de exposição. Pode-se citar, por exemplo, que o mercúrio se acumula em tecido muscular e o chumbo no sangue (quando a exposição é recente) e em tecido ósseo (quando a exposição é de longo prazo). Em geral, as brânquias, fígado, rim e músculo têm o maior potencial para estimar a exposição ou biodisponibilidade. Para espécies pequenas (<10 cm), pode-se examinar o corpo na íntegra ou concentrações na carcaça após a remoção do trato digestivo. Os moluscos também podem acumular metais em seu tecido muscular (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Os minerais como cobre, selênio, ferro e zinco são micronutrientes essenciais para peixes e mariscos, outros elementos como mercúrio, cádmio e chumbo são tóxicos mesmo em baixas concentrações quando ingeridas durante um longo período. Estes elementos estão presentes no meio aquático como resultado de fenômenos naturais como vulcanismo marinho e eventos geológicos e geotérmicos, mas também são causados por poluição antropogênica resultantes da metalurgia intensiva e mineração, eliminação de resíduos e incineração, e da chuva ácida causada pela poluição industrial. Isto está em contraste com os compostos orgânicos, muitos dos quais são de origem humana trazido para o ambiente aquático através dos efluentes domésticos (HITES *et al.*, 2004).

No caso das dioxinas e furanos, elas bioacumulam na parte gordurosa dos organismos podendo atingir o topo da cadeia alimentar. A principal rota de exposição nos peixes e moluscos é a água (ASSUNÇÃO; PESQUERO, 1999).

4.5.1 Seleção das Espécies

As espécies utilizadas para a análise dos tecidos podem ou não serem as mesmas utilizadas na pesquisa dos peixes. Os mesmos critérios de seleção da espécie devem ser usados tais como: estar presente no ambiente; ser de subsistência e/ou espécies comerciais; podendo incluir moluscos e crustáceos. A escolha do tecido utilizado para a análise deve ser com base na parte consumida localmente, incluindo o músculo, fígado, ovos, hepatopâncreas (crustáceos) e osso. Para moluscos, peças inteiras moles do corpo devem ser recolhidas. Para lagosta ou caranguejo, tecido comestível (por exemplo, músculo, ovos, hepatopâncreas) deverão ser recolhidos (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

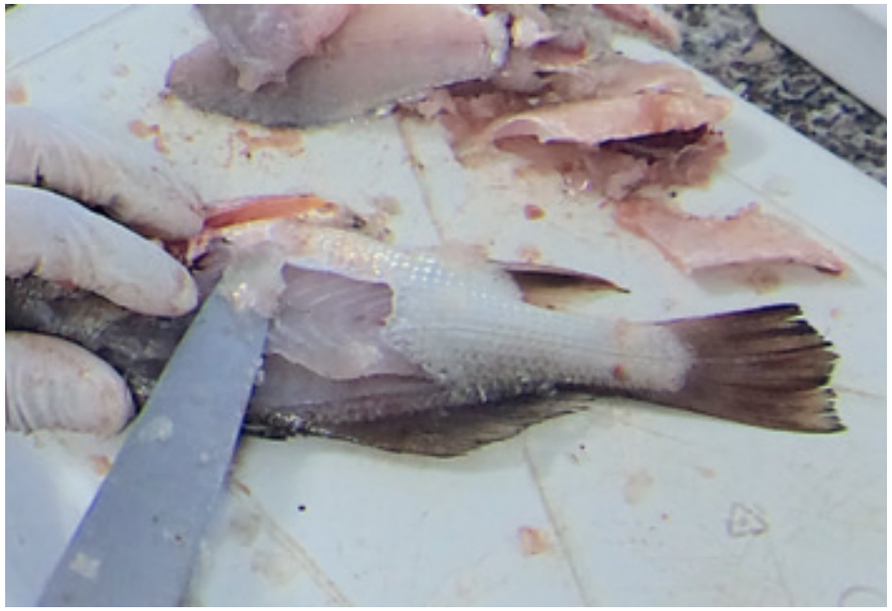
4.5.2 Coleta das Amostras e Preparação

A coleta das amostras pode ser realizada durante uma determinada época do ano, com coletas independentes.

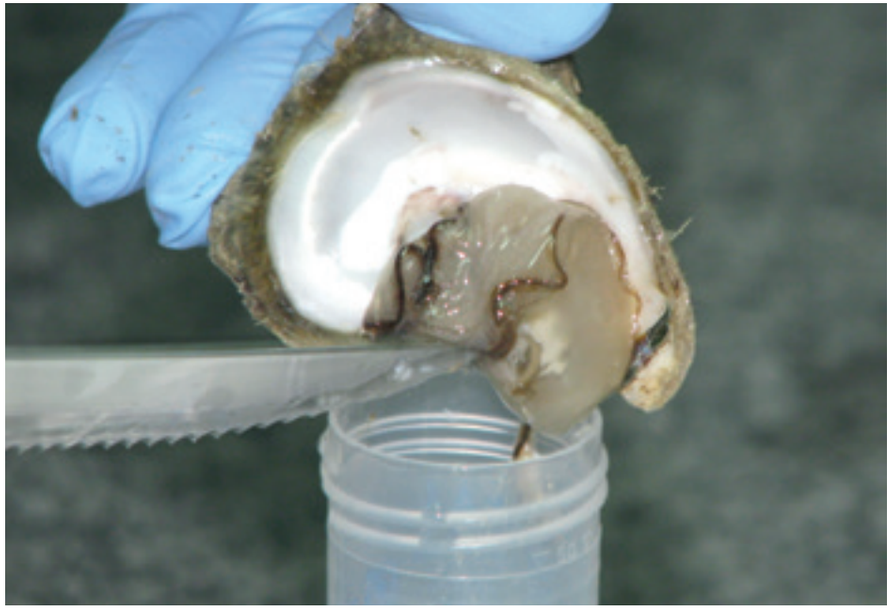
Para análise dos tecidos é recomendado a coleta de 8 amostras (para alcançar 95% de potência) de uma única espécie a partir de cada área de exposição e a área de referência, para um mínimo de 16 amostras. As 8 amostras podem ser de tecidos a partir de oito peixes individuais ou de amostras compostas (ENVIRONMENT CANADA, 2012). As análises de espécies pequenas e moluscos devem ser realizadas em uma amostra composta de 7 a 10 indivíduos (de acordo com os requisitos de laboratório) de uma única espécie da área de exposição (ENVIRONMENT CANADA, 2010). Recomenda-se o uso de peixes do mesmo tamanho e do mesmo sexo.

Após a coleta dos organismos nos pontos, os mesmos devem ser lavados com a água local e, em seguida, colocados em sacolas plásticas (para evitar contaminação por outras fontes tais como combustível do barco ou contato com peixes de outros pontos), identificados com data e nome do ponto e encaminhados para o laboratório.

Para a retirada do tecido em laboratório, é recomendado a lavagem de todo o material utilizado com sabão, água deionizada e ácido nítrico (10%); após a lavagem, os tecidos de peixe são retirados em filés, com uma faca de aço inoxidável ou faca de cerâmica; é recomendado a retirada de duas a 20 g retirando fragmentos menores, mas superiores a 2 g (Figura 4.10). Os peixes maiores proporcionaram fragmentos na quantidade ideal. Cada fragmento retirado deverá ser acondicionado individualmente em recipientes plásticos devidamente etiquetados com os dados do local de coleta e do espécime correspondente. Em seguida, deverão ser armazenados em *freezer* e congelados a uma temperatura de -20°C para posterior transporte até o encaminhamento para o laboratório analítico para determinação química. Para os moluscos, as partes do corpo



A



B

Figura 4.10 Ⓐ Filetagem dos tecidos de peixes e Ⓑ de moluscos.

macio devem ser recolhidas, as amostras devem ser manipuladas como descrito acima para tecidos de peixes.

É importante salientar que a cada batelada de análises laboratoriais, a cada campanha, seja realizado, em paralelo, a análise de amostra padrão referência internacional de matriz biológica (peixe, molusco) para verificação da qualidade dos dados.

4.5.3 Análise dos Dados

Os resultados encontrados para os metais deverão ser comparados com resoluções vigentes; em outubro de 2015, a Resolução da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária n°42/2013 (ANVISA, 2013) estabelece os limites máximos permissíveis de chumbo, cadmio, arsênio e mercúrio em mariscos para consumo humano; enquanto que o Decreto n°55.871/1965 (BRASIL, 1965) estabelece os limites de cobre, cromo, níquel e zinco (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Limite máximos de contaminantes em peso úmido estabelecidos pela Resolução Anvisa nº 42/2013 e Decreto nº 55.871/6195.

	Resolução Anvisa nº 42/2013	Decreto nº 55.871/1965
Arsênio	1,0 mg/Kg	--
Cádmio	2,0 mg/Kg	--
Chumbo	1,5 mg/Kg	--
Cobre	--	30,0 mg/Kg
Cromo	--	0,1 mg/Kg
Mercúrio	0,50 mg/Kg	--

Os resultados de dioxinas e furanos deveram ser expressos em concentração pg/g PU (Peso Úmido) de tecido total e também em TEQ total (Equivalente Tóxico), conforme estabelecido pelo EPA, calculado sobre a concentração em pg/g PU. Os resultados deverão ser comparados com limites legais vigentes no Brasil ou, na ausência deste, com limites legais de outros países, como por exemplo o valor de 4 pg/g PU estipulado pela Diretriz Europeia nº 2375/2001 em 29 de novembro de 2001 (EUROPA, 2001).

5 Efeitos no habitat: comunidade de invertebrados bentônicos

Karla Gonçalves da Costa
Mark Ervin Mcmaster
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick
Tatiana Heid Furley

5.1 Considerações Gerais p133

5.2 Ciclos de Amostragens p134

5.3 Considerações para Elaboração do Desenho Amostral em Estudos de Invertebrados Bentônicos p134
- 5.3.1 Fatores que Interferem nos Resultados: p135
- 5.3.2 Coleta de Amostras p136

5.4 Métodos de Campo para Monitoramento de Invertebrados Bentônicos p136
- 5.4.1 Tamanho da Malha p136
- 5.4.2 Equipamentos de Amostragens p137
- 5.4.3 Fixação e Preservação dos Espécimes p137
- 5.4.4 Recomendações para Coleta de Invertebrados Bentônicos p138

5.5 Métodos de Laboratório p140
- 5.5.1 Nível Taxonômico de Identificação p140
- 5.5.2 Coleção de Referência p140
- 5.5.3 Recomendações para Análises de Invertebrados Bentônicos em Laboratório p141

5.6 Análise e Interpretação dos Dados p141
- 5.6.1 Métodos de Tratamento de Dados p141

5.7 Orientações para Registros de Dados p144

5.8 Descritores da Comunidade de Macroinvertebrados p145

5.9 Avaliação dos Resultados p146
- 5.9.1 Efeito na Comunidade de Invertebrados Bentônicos p146

5.10 Próximos Passos p148

5.11 Efeitos Esperados p148

5.1 Considerações Gerais

A análise da estrutura das comunidades bentônicas tem sido muito útil na elaboração de estudos ecológicos ou diagnósticos ambientais (WARWICK, 1986). Este fato decorre, principalmente, do modo de vida característico desses organismos que estão associados ao sedimento e por sua baixa mobilidade, quando comparado a outros bioindicadores aquáticos. Por esses fatores, os macroinvertebrados bentônicos estão sujeitos ao efeito de descarga de efluentes, o que favorece sua utilização em diagnósticos ou monitoramentos ambientais (UNESCO, 1980; CANFIELD *et al.*, 1994; CLARKE; WARWICK, 1994; WEISBERG *et al.*, 1997).

O estudo dos invertebrados bentônicos tem como objetivo a avaliação da magnitude e da extensão geográfica da degradação ambiental, devido ao enriquecimento orgânico ou outras formas de contaminação, além da análise da viabilidade da fonte alimentar para os peixes selecionados para o estudo. Para isso, é preciso determinar se existem diferenças estruturais (*i.e.*, densidade total de organismos, número de táxons, alterações nos táxons dominantes) nas comunidades de invertebrados próximas à descarga de efluente em relação à comunidade a ser considerada referência.

Para que o estudo da comunidade de invertebrados bentônicos seja realizado, serão recolhidas amostras de sedimento em áreas sob o efeito de efluentes e em áreas referência para determinar: Ⓐ descritores biológicos da comunidade bentônica (densidade total de invertebrados bentônicos, riqueza taxonômica e índices de Equitabilidade e Diversidade de Simpson); Ⓑ tamanho da partícula do sedimento e concentração de carbono orgânico total e Ⓒ proporção de carbono/nitrogênio, potencial redox (Eh) e sulfetos.

O objetivo desse capítulo é fornecer um guia sobre o desenho amostral, padronização metodológica e interpretação de dados em estudos de comunidade de invertebrados bentônicos em relação aos requerimentos do Monitoramento de Efeito Ambientais (MEA).

5.2 Ciclos de Amostragens

Primeira amostragem

O primeiro ciclo de amostragens tem por objetivo caracterizar a comunidade bentônica em ambientes mais amplos que podem ser influenciados pela descarga de efluentes e estabelecer uma linha de base na qual as futuras amostragens serão comparadas. Esse ciclo também permitirá uma avaliação crítica da técnica de amostragem, levando em consideração a necessidade de refinar o desenho amostral em ciclos futuros ou a introdução de técnicas de monitoramento alternativas. Além disso, o primeiro ciclo é fundamental para definir áreas que sejam relativamente homogêneas em termos de tipos de *habitat* e que tenham alcance específico de exposição à descarga de efluentes para identificar as áreas referência.

O desenho amostral do primeiro ciclo de amostragem de invertebrados bentônicos deve incluir:

- Um período/estação ecológica relevante (*e.g.*, período seco ou chuvoso);
- Áreas referência, próximas ao ponto de descarga de efluente e outra a 1.000 m de distância do efluente.
- *Habitats* ecologicamente relevantes;
- Padronização de métodos de campo e de laboratório.

Subsequentes ciclos de monitoramento de efeito ambiental são sugeridos para confirmar os resultados do primeiro ciclo, ajudando a refinar as técnicas de monitoramento quando necessário e para determinar os fatores que levam a algum efeito detectado.

5.3 Considerações para Elaboração do Desenho Amostral em Estudos de Invertebrados Bentônicos

O desenho amostral para coletas de invertebrados bentônicos deve ser específico para cada local. É importante levar em consideração fatores como viabilidade, variabilidade, características espaciais e extensão da área a ser estudada, tanto para o local de referência como para a possível área impactada.

Para o primeiro ciclo de amostragem recomenda-se que o estudo contenha:

- Ao menos duas áreas de estudo: referência e possível área impactada;
- Ao menos três pontos de coleta em cada uma das áreas de estudo;
- No mínimo três réplicas.

Sugere-se também que seja amostrado apenas o *habitat* dominante das áreas de estudo. Dessa forma, a variabilidade dos dados será reduzida. Quando as áreas de estudos são extremamente heterogêneas ou quando dois tipos de *habitats* são igualmente dominantes, possivelmente haverá um maior esforço amostral que o mínimo previamente sugerido. Um maior esforço amostral, além do mínimo, pode incluir: adição de uma ou mais áreas referência, adição de áreas cada vez mais distantes, aumento de pontos por área ou réplicas adicionais por pontos.

5.3.1 Fatores que Interferem nos Resultados:

A interpretação dos dados bentônicos nem sempre é fácil, principalmente se determinados fatores estiverem atuando no local. Quatro categorias de tais fatores incluem:

Fatores ambientais: fatores ambientais podem dificultar a interpretação dos efeitos na comunidade bentônica causados pela descarga do efluente dos efeitos originados a partir das alterações naturais do *habitat*. Para reduzir o problema, recomenda-se ampliar o desenho amostral, com amostras de todos os tipos de *habitat* para melhor caracterizar as condições da área de referência. Algumas das variáveis que potencialmente causam mais confusão podem ser analisadas aplicando estudos mais apropriados e desenhos amostrais que incluam gradientes de profundidade, tamanho da partícula do substrato, eventos raros e interanuais, variabilidades sazonais ou de longo prazo nas características físicas como, temperatura e regimes de marés. Isso pode facilitar a interpretação da influência de variações em fatores ambientais através de análises de correlação com os indicadores bentônicos.

Descargas múltiplas ou efeito histórico: a dificuldade de interpretação dos dados também vai existir se as áreas estiverem sob efeito de vários efluentes ou estressores, ou de modificações históricas no *habitat* como barragens ou represamentos. Nesse caso, sugere-se alteração no desenho amostral.

Época de amostragem: a época do ano ou determinado ano de amostragem pode confundir a interpretação dos efeitos de efluentes na comunidade bentônica. Isso pode ser avaliado com o conhecimento sobre a fenologia das espécies que constituem a comunidade bentônica

(*i.e.,* relação entre clima e ciclo de vida) e análise de dados coletados em anos anteriores em locais referência.

Métodos de amostragens: se os métodos padrões (*e.g.,* tipo de amostrador, tamanho e abertura de malha, níveis taxonômicos) não são consistentes, a resposta da comunidade bentônica à descarga de efluentes pode ser obscurecida. Uma possível solução é examinar os dados mais detalhadamente e convertê-los a níveis comparáveis (*i.e.,* converter toda a identificação taxonômica ao nível acima em comum). Entretanto, em muitos casos, é necessário que o estudo seja redesenhado de forma que a padronização dos métodos seja efetivamente aplicada para que esses problemas sejam resolvidos. O tipo de amostrador, o tamanho da malha e o nível de identificação taxonômica devem ser os mesmos entre áreas expostas e de referência. Se o *habitat* é diferente, então diferentes áreas de referência precisam ser localizadas até que se encontre alguma com *habitat* semelhante à zona exposta.

5.3.2 Coleta de Amostras

É recomendável que os pontos amostrais sejam permanentes para evitar problemas de interpretação numa avaliação temporal. Em caso de estudos em ambientes estuarinos, deve-se sempre levar em consideração a variação da salinidade devido ao movimento de descida e subida da maré. Quanto mais próximo à foz, maior será a quantidade de organismos eurialinos, o que pode diferir dos pontos a montante à medida que reduz a variação da salinidade. Nesse caso, quando a área de descarga de efluentes estiver localizada mais a montante no estuário, o melhor é encontrar um outro sistema de rio para usar como local de referência ou mesmo uma área mais a montante da área de descarga como controle da alteração na salinidade.

5.4 Métodos de Campo para Monitoramento de Invertebrados Bentônicos

5.4.1 Tamanho da Malha

Amostras de bentos tipicamente contêm muita quantidade de sedimentos finos e outras pequenas partículas. Para evitar o choque osmótico dos animais e o transporte e armazenamento de grande volume de amostra, sugere-se que as amostras sejam lavadas em peneiras ainda no campo. O peneiramento deve ser feito, sempre que possível, logo após a coleta e antes da fixação visto que vários organismos ficam frágeis e quebradiços após a fixação.

Recomenda-se uma abertura de malha de 500 µm para peneirar os macroinvertebrados bentônicos.

Macroinvertebrados marinhos são tipicamente aqueles retidos em peneiras de tamanho entre 500-1000 µm (ELEFTHERIOU; MCINTYRE, 2005; GRAY *et al.*, 1990). Esse intervalo irá reter cerca de 95% da biomassa de macrofauna marinha, enquanto reduz o número de juvenis e táxons da meiofauna presente e que respondem distintamente às perturbações ambientais (SCHWINGHAMER, 1981, 1983; WARWICK, 1986). Esse tamanho de malha será aplicado em todos os equipamentos utilizados no campo e laboratório (*i.e.*, saco de malha para lavagem no campo e peneira usada em laboratório).

5.4.2 Equipamentos de Amostragens

Amostragem quantitativa da comunidade bentônica ocorre quando as amostras possuem uma área ou volume conhecido. Os dispositivos de amostragem devem ser não seletivos e específicos para um substrato particular. Amostras bentônicas coletadas de substratos naturais fornecem uma indicação dos estressores do passado e presentes. Os amostradores devem ser compatíveis com todos os tipos de *habitats* de todas as áreas e pontos.

Em ambientes rasos, pode-se usar um tubo (PVC ou acrílico) de 10 cm de diâmetro e introduzi-lo a 10 cm de profundidade no sedimento. Já em locais mais profundos, as coletas serão realizadas em barco com auxilio de coletores do tipo busca-fundo (Figura 5.1). Eleftheriou e McIntyre, (2005) fazem uma boa revisão dos métodos de amostragens de bentos marinho. O importante é que o amostrador definido seja utilizado em todos os pontos de coleta.

5.4.3 Fixação e Preservação dos Espécimes

Todas as amostras devem ser fixadas em campo em uma solução de formol diluído em água do próprio ambiente a 4% (TURRA; DENADAI, 2015). A preservação diretamente em álcool frequentemente resulta em organismos moles e de difícil manuseio. Devido às características carcinogênicas e irritante do formol, é recomendado o uso de luvas e protetores oculares como equipamentos de segurança. Além disso, as amostras fixadas devem ser armazenadas em sacos plásticos devidamente lacrados ou potes vedados para o transporte ao laboratório. Todas as amostras devem ser devidamente identificadas utilizando marcadores que não se apaguem com água ou formol. As amostras devem ser preservadas tão logo sejam coletadas para prevenir que alguns espécimes sejam predados por outros contidos na amostra.

5.4.4 Recomendações para Coleta de Invertebrados Bentônicos

A seguir é apresentada uma lista de procedimentos para manter a qualidade dos dados. Os procedimentos padrões no campo devem seguir os protocolos apropriados e ter os equipamentos de amostragem necessários ao estudo. Alguns dos principais procedimentos são listados:

- Todo o pessoal envolvido nas coletas de campo deve ter treinamento apropriado e experiência com os equipamentos de campo e seus objetivos;
- Todas as medidas de segurança devem ser identificadas, compreendidas e cumpridas;
- Os equipamentos de coleta devem ser apropriados para o estudo e para os grupos de invertebrados selecionados e devem ter sua manutenção realizada regularmente;
- Deve haver algum critério a priori de aceitabilidade da amostra coletada caso alguma diretriz falhe (*i.e.*, quando o busca-fundo é lançado e volta com metade da amostra, Gray *et al.* 1990). Lembrando que, nesse caso, não se deve lançar o busca-fundo novamente para completar a amostra. Além disso, métodos de amostragem devem ser consistentes durante todo o estudo;
- Uma descrição das amostras coletadas deve ser feita para descrever as características do sedimento, como cor, odor, texturas e presença de algum resíduo ou material;
- Após a coleta, as amostras devem ser lavadas ainda em campo, antes de sua fixação;
- As amostras devem ser armazenadas em recipientes adequados e conservados para evitar quebras e deterioração dos organismos;
- Todas as amostras devem ser apropriadamente identificadas (etiquetas ou rótulos);
- Notas de campo devem ser realizadas em qualquer equipamento, preferencialmente à prova d'água;
- Transporte e armazenamento das amostras devem ser adequadamente realizados.

Figura 5.1 Exemplo de amostrador utilizado nas coletas da comunidade bentônica.

5.5 Métodos de Laboratório

Em laboratório, as amostras serão novamente lavadas em malha de 500 µm para retirada do formol e, em seguida, triadas por elutriação. O método de elutriação consiste em colocar a amostra num pote em água corrente por aproximadamente 10 minutos. Esse pote deve ficar acima de uma peneira de malha de 500 µm, de forma que a água escorra do pote para a peneira, misturando o sedimento para que os organismos se soltem ficando retidos na peneira de malha. Todo o material retido na peneira será colocado em placa de Petri e levadas para triagem em estereomicroscópio. Todos os invertebrados bentônicos observados serão retirados e colocados em potes identificados e conservados em álcool diluído a 70%. Os potes devem ter boa vedação para evitar a evaporação do álcool.

5.5.1 Nível Taxonômico de Identificação

A identificação dos invertebrados bentônicos coletados deve ser adequada aos objetivos do programa de monitoramento. Pesquisas indicam que a identificação a categoria de família é suficiente para detectar respostas da comunidade bentônica sujeita a perturbações humanas (WARWICK, 1988a, 1988b).

5.5.2 Coleção de Referência

Consistência na identificação taxonômica dentro de entre pesquisas é essencial para obter informações úteis sobre monitoramento de efeitos ambientais. No entanto, para proposta comparativa e controle de qualidade de identificação taxonômica, é recomendada a manutenção de uma coleção de referência dos organismos encontrados nos estudos. Além disso, é recomendado que um taxonomista profissional verifique as identificações da coleção. Coleções de referência têm muitos benefícios, incluindo seu uso na confirmação das identificações, garantindo a taxonomia consistente entre pesquisas e a formação de pessoal. Seguindo essa recomendação, cada área de estudo teria uma coleção de referência completa com vários espécimes de indivíduos de tamanhos representativos para cada táxon. A coleção poderá ser mantida pelo próprio órgão ambiental, empresa interessada, universidade ou museu.

5.5.3 Recomendações para Análises de Invertebrados Bentônicos em Laboratório

É recomendado que o material triado e preservado de cada pesquisa fique armazenado apropriadamente ao menos por seis anos ou até que mais nenhuma informação seja solicitada dessas amostras. Para evitar que erros de processamento ocorram, os seguintes itens devem ser incluídos:

- Todo pessoal envolvido no processamento e análise das amostras deve ser treinado;
- Referências taxonômicas apropriadas devem ser usadas para o tipo de *habitat* e local geográfico;
- Uma coleção de referência completa para cada área de coleta deve ser compilada e verificada por um taxonomista externo;
- Deve ser criado um sistema para arquivamento de amostras;
- Deve ser mantido um detalhado protocolo de processamento de amostras e notas de laboratório.

5.6 Análise e Interpretação dos Dados

5.6.1 Métodos de Tratamento de Dados

Recomendações para Entrada e Verificação de Dados

Após a entrada dos dados, o primeiro passo na análise é verificar se há erros de transcrição. Qualquer falha invalida novas análises. Todas as entradas de dados no computador devem ser verificadas. Mantenha sempre salvo uma cópia dos dados brutos. Dados perdidos devem ser diferenciados das ausências de táxons. Perder dados da amostra é diferente de não ter organismos. Zero será usado para ausência de táxons, enquanto algum código diferente de zero pode ser usado para definir a perda do dado. Outras considerações a respeito da verificação e análise dos dados são listadas abaixo:

- Solicite ajuda de pessoal treinado e experiente;
- Realize exercícios para identificar erros de transcrição, *outliers* e outros dados suspeitos;
- Mantenha sempre uma planilha eletrônica com os dados brutos;

- Registre os métodos (testes estatísticos específicos) e *software* (se aplicável) usado para análise;
- Tenha anotações detalhadas sobre as análises dos dados.

Lidando com os 'Outliers'

Supondo que os dados foram inseridos corretamente, os dados devem ser resumidos, rastreados os *outliers* e valores errados, analisado quanto à normalidade e transformados, se necessário. Valores extremos que não são erros não devem ser removidos dos dados porque resultará na perda de uma informação e a perda de poder na pesquisa sobre a comunidade de invertebrados bentônicos. Ao invés disso, valores extremos devem ser identificados e a influência do valor extremo no resultado deve ser determinado pela reanálise dos dados, menos o valor extremo.

Organismos Não Identificados ou Imaturos

Algumas amostras podem conter indivíduos imaturos que não podem ser identificados à precisão taxonômica recomendada. Uma situação similar pode ocorrer quando amostras não são devidamente preservadas e as características de identificação são destruídas. Para elaboração de uma correta planilha de dados brutos, esses táxons não identificados e suas abundâncias devem ser listados nos relatórios. Entretanto, para a análise de dados, o investigador precisa decidir se inclui ou não esses indivíduos desconhecidos. As opções incluem:

- Não incorporar formas imaturas ou bastante danificadas;
- Agrupar todos os espécimes (*i.e.*, matura/imatura, identificado/não identificado) e classificá-las em uma categoria taxonômica mais alta;
- Manter os táxons não identificados e imaturos como categorias separadas na análise.

Qualquer uma das escolhas acima dependerá da experiência do pesquisador responsável, entretanto, ela deve ser definida na metodologia do relatório do trabalho.

Em pesquisas com invertebrados marinhos é recomendado que os imaturos e juvenis sejam contados e enumerados separadamente dos adultos, sendo ou não identificados a categoria de espécie. Dessa forma, as associações dos adultos podem ser analisadas e interpretadas sem a confusa influência dos juvenis transitórios. Então, as análises de dados devem mostrar os resultados com e sem a inclusão dos imaturos. Isso ocorre porque os organismos bentônicos recém-assentados possuem diferentes características de sobrevivência dos indivíduos adultos, que já estão presentes no sedimento há muito mais tempo e integrados aos efeitos da perturbação ambiental. Dependendo do período da amostragem, os juvenis recém-assentados podem ser abundantes nas amostras, mas podem morrer em poucos dias devido aos estressores ambientais, predação e competição. Mesmo assim a informação dos dados dos imaturos é importante. Variações dramáticas no assentamento de imaturos entre amostras vizinhas dentro de ambientes fisicamente homogêneos podem ser indicativos de variados níveis de estresse.

Transformação e Redução de Dados

Transformações de dados somente devem ser aplicadas com uma completa compreensão de seus efeitos nos dados e de sua interpretação e somente se realmente necessárias na análise estatística.

Transformações devem:

- Normalizar distribuições;
- Tornar variâncias heterogêneas em homogêneas;
- Linearizar as relações entre variáveis;
- Reduzir o efeito dos táxons dominantes dentro de um conjunto de dados numa análise multivariada;
- Reduzir o problema analítico de muitos zeros numa matriz de dados.

Reduções de dados devem ser feitas apenas para auxílio nas análises estatísticas e pelas mesmas razões que a transformação de dados. Reduções de dados podem ocorrer pela eliminação de táxons raros ou redução das subamostras coletadas por agrupamento ou média.

Transformações logarítmicas são frequentemente usadas em dados de invertebrados bentônicos porque a abundância dos organismos tipicamente varia exponencialmente (GREEN, 1979). A transformação em log irá reduzir a importância dos táxons numericamente abundantes e melhorar a probabilidade de resolver a estrutura quando as diferenças são devido aos táxons de abundâncias médias ou raras. No entanto, pesquisadores enfatizam que é preciso analisar bem os dados da comunidade para determinar qual a transformação mais apropriada. Desta forma, é possível verificar ou não se a transformação utilizada estabilizou a variância.

5.7 Orientações para Registros de Dados

Todos os dados devem ser inseridos numa planilha eletrônica. O conjunto de dados completo, incluindo os táxons raros, os altamente variáveis e as identificações ambíguas, deve ser armazenado, mesmo se os dados tenham sido filtrados para o cálculo dos descritores da comunidade. Uma lista com os detalhes relevantes para o campo, laboratório e análise de dados do monitoramento ambiental dos invertebrados bentônicos é fornecido abaixo. Todos esses detalhes devem ser incluídos para interpretação do estudo.

Registros de Campo:

- Planilha de campo deve ser mantida por seis anos;
- Coordenadas geográficas dos locais para replicação;
- Data e hora da amostragem;
- Membros componentes do campo;
- Descrições do *habitat*, incluindo medidas das variáveis ambientais de apoio;
- Métodos de amostragens utilizados, incluindo o tipo de tamanho do amostrador e tamanho da malha da peneira.

Registros de Laboratório:

- Planilhas de anotações devem ser mantidas por seis anos;
- Relato de dados para cada indivíduo ou agrupamento de subamostras, listando a presença de táxons e número de indivíduos;
- Método de triagem utilizado;
- Categoria taxonômica alcançada;
- Localização da coleção de referência e registro sobre a verificação taxonômica.

Registros da Análise de Dados:

- Tabela contendo o número de indivíduos por táxons em cada amostra;
- Tabela com os descritores calculados e as variâncias estimadas;
- Efeitos dos *outliers* ou valores extremos nos resultados (se houver);
- Resumo de adesão dos dados aos objetivos, procedimentos operacionais padrão, protocolos de amostragem e quaisquer problemas de identificação.

5.8 Descritores da Comunidade de Macroinvertebrados

Os índices abaixo são propostos por Environment Canada (2010; 2012). Os índices de densidade total de organismos e riqueza taxonômica são amplamente utilizados em trabalhos de comunidade bentônica. Além deles, os índices de equitabilidade (equidade ou equitatividade) de Pielou e de diversidade de Shannon-Wiener também são indicados e podem ser usados ao invés dos índices de equitabilidade e diversidade de Simpson. O interessante é que os índices escolhidos sejam mantidos em todos os estudos para fins de comparação.

Densidade Total de Invertebrados: o número total de indivíduos, de todas as categorias taxonômicas coletadas nas áreas de estudos deve ser expresso por unidade de área (*e.g.*, inds/m²). Valores devem ser registrados para cada réplica, assim como a média aritmética ± erro padrão (EP), ± desvio padrão (DP), mediana, mínimo e máximo por ponto.

Riqueza Taxonômica: o número total de diferentes categorias taxonômicas coletadas nas réplicas e a média aritmética ± EP, ± DP, mediana, mínimo e máximo por ponto.

Índice de Equitabilidade de Simpsom (E): equitabilidade pode ser quantificada para cada réplica e a média ± EP, ± DP, mediana, mínimo e máximo por ponto devem ser registrados. Equitabilidade é calculada como proposto por Smith e Wilson (1996):

$$E = 1 / \sum_{i=1}^{S} (Pi)^2 / S$$

Onde:
E = Equitabilidade
Pi = A frequência relativa do táxon na réplica
S = O número total do táxon na réplica

Índice de Diversidade de Simpson (D): este índice não considera apenas o número de espécies e o total de número de indivíduos, mas também a proporção do total de ocorrência de cada espécie. Neste índice, quanto **menor** for a diversidade, **maior** será o valor de D. Valores devem ser registrados para cada réplica, assim como a média aritmética ± erro padrão (EP), ± desvio padrão (DP), mediana, mínimo e máximo por ponto. De acordo com este índice, a probabilidade de dois indivíduos retirados aleatoriamente de uma comunidade pertencerem à mesma espécie é dada por:

$$D = \sum_{i=1}^{S} Pi^2$$

Onde:
D = Índice de diversidade de Simpson
Pi = é a proporção do táxons i na réplica
S = número de táxons na réplica

Densidade por táxon: o número total de indivíduos por táxon (*i.e.*, família) é expresso por unidade de área (ind./m_2). Valores devem ser registrados para cada táxon de cada réplica e a média (± EP) por ponto.

Proporção taxonômica: a porcentagem da abundância por táxon em cada réplica e a média (± EP) por táxon para o ponto.

Presença/ausência: deve ser elaborada uma matriz indicando a presença e ausência de cada táxon por ponto amostral. A matriz consistirá de pontos (colunas) e táxons (linhas).

Em adição aos descritores biológicos, as variáveis do sedimento também devem ser registradas e apresentadas.

5.9 Avaliação dos Resultados

5.9.1 Efeito na Comunidade de Invertebrados Bentônicos

O objetivo da avaliação da comunidade de invertebrados bentônicos no programa de MEA é responder as seguintes questões:

Saúde do Ambiente

1. Qual é a situação atual da comunidade de invertebrados bentônicos nestes ambientes?
   - a. Qual é o padrão normal na área referência?
   - b. Quais são os resultados normais esperados para serem encontrados na área sob influência do efluente?
   - c. Existem alterações significativas desde que ocorreram os estudos históricos?
2. Existem diferenças na comunidade bentônica entre as áreas de referência e locais potencialmente impactados? Caso existam, essas diferenças estão estáveis temporalmente?

Efeitos Cumulativos

3. É possível identificar qual é a causa da variabilidade nas respostas da comunidade bentônica?

Esta última pergunta é o foco do programa de MEA. Ao longo do tempo, com mais informações (resultados) sobre o monitoramento, é possível se desenhar programas mais sensíveis.

Durante o programa de monitoramento, os seguintes descritores biológicos devem ser calculados, registrados e analisados para determinar se houve algum efeito na comunidade de invertebrados bentônicos:

- Densidade total de invertebrados bentônicos;
- Riqueza taxonômica;
- Índice de equitablidade;
- Índice de diversidade.

Além disso, é recomendado que os seguintes descritores também sejam calculados e registrados:

- Densidade taxonômica;
- Proporção taxonômica;
- Presença/ausência de táxons.

Se necessário, descritores adicionais específicos de cada área amostral podem ser calculados e utilizados para auxiliarem na interpretação de possíveis efeitos.

Para testar a significância dos descritores biológicos poderão ser aplicadas análises de variância (ANOVA). A normalidade e homogeneidade das variâncias deverão ser previamente testadas e transformações de dados deverão ser utilizadas caso necessário. Para as estatísticas multivariadas poderão ser utilizadas análises de ordenação (MDS), de similaridade (ANOSIM), de classificação (SIMPER) como proposto por Elliot (1979), Field, Clark e Warnick (1982), Burd, Nemec e Brinkhurst (1990), Clarke e Ainsworth (1993) e Clarke e Warwick (1994).

5.10 Próximos Passos

Se houver alguma diferença estatística nos descritores da comunidade bentônica entre áreas sob descarga de efluentes e áreas referência (ou ao longo de um gradiente), é possível concluir que há efeito na comunidade de invertebrados bentônicos. Se houver suspeita de amostragem insuficiente para se detectar um possível efeito, deve-se reconsiderar o número de amostragens (mais réplicas, mais pontos ou mais períodos de coletas) para melhorar a interpretação dos resultados. Vale ressaltar que deve ser verificado o poder do teste usado.

Caso tenha sido encontrado um efeito na comunidade, deve-se questionar se a descarga de efluente realmente foi a responsável pelo efeito.

Será que as mudanças naturais nas características do ambiente podem ter causado esses efeitos? Será que outras causas antropogênicas também estão interferindo nos resultados? Será que o efeito é reflexo de um evento casual?

Todos esses fatores podem gerar confusão e dificuldade para determinar se realmente a descarga de efluentes foi o causador do efeito na comunidade bentônica. Nesse caso, deve se reconsiderar um novo desenho amostral para o próximo ciclo de coletas.

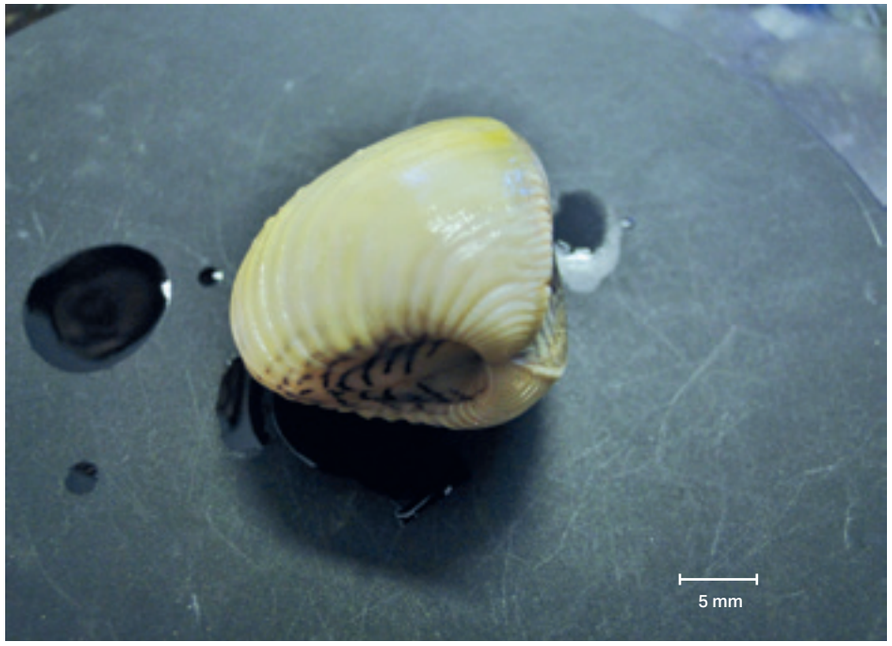
5.11 Efeitos Esperados

Os ecossistemas aquáticos estão sujeitos a diversas fontes de perturbação, seja de origem natural, como alterações sazonais nas características do ambiente, ou antrópica, como o despejo de resíduos industriais e domésticos muitas vezes não tratado. No entanto, as perturbações de origem antrópica nos sistemas aquáticos provocam alterações na qualidade da água e do sedimento e, geralmente, diminuem a capacidade do sistema de manter suas comunidades. Os invertebrados bentônicos são indicadores ideais, pois sua presença, abundância e/ou comportamento refletem o efeito de um estressor na biota (BONADA *et al.*, 2006).

Em ambientes estuarinos, existem alguns fatores naturais que podem confundir a interpretação dos resultados, pois os sedimentos são naturalmente enriquecidos organicamente e a salinidade pode alterar muito. O acúmulo de matéria orgânica no sedimento proveniente dos resíduos despejados nos estuários é um dos fatores responsáveis por possíveis mudanças estruturais na comunidade bentônica. Como exemplo, podem ocorrer mudanças na abundância de organismos, com a redução de algumas espécies e um aumento na quantidade de oportunistas, além de mudanças morfológicas, comportamentais e fisiológicas dos organismos (DE GRAVE; WHITAKER, 1999; LENIHAN *et al.*, 2003).

Uma revisão dos principais padrões de resposta da comunidade bentônica exposta a efluentes de fábricas de celulose no Canadá foi feita por Lowell *et al.* (2004). Nesse artigo é possível ver que em situações que ocorram eutrofização média ou moderada, as principais respostas observadas na comunidade bentônica são: aumento nos valores de abundância e riqueza taxonômica. Já nas situações que ocorrem alta eutrofização no ambiente, ocorre a diminuição da riqueza taxonômica, mesmo ocorrendo um aumento na abundância de organismos. Além disso, ocorre também perda da abundância e riqueza devido à toxicidade no ambiente e por sufocamento dos organismos causado por sólidos. O programa de monitoramento ambiental de efluentes de mineração realizado no Canadá tem demonstrado mais de uma resposta tóxica para muitos dos seus efluentes como a redução na abundância e riqueza taxonômica, e a presença de táxons tolerantes a poluição.

Durante as coletas do Projeto Peixe Guia realizadas nos estuários dos rios Benevente, Jucu e Santa Maria da Vitoria foram encontrados organismos de diversos filos com maiores densidades para os moluscos, poliquetas e tanaidáceos (Figura 5.2: A, B e C).



A

B

C

Figura 5.2 Organismos mais abundantes encontrados nas coletas do Projeto Peixe Guia. Ⓐ Molusco bivalve *Anomalocardia brasiliensis*; Ⓑ *Polychaeta* Família *Nereididae*; Ⓒ *Tanaidacea Monokalliapseudes schubarti.*

6 Caracterização de efluentes e monitoramento da qualidade da água

Jairo Oliveira
Larry Mark Hewitt
Joanne Louise Parrott

6.1 Considerações Gerais p157

6.2 Plano de Amostragem p158
- 6.2.1 Frequência da Amostragem p160
- 6.2.2 Definição dos Pontos de Coleta p161
- 6.2.3 Definição do Número e Volume das Amostras p162
- 6.2.4 Seleção dos Parâmetros a Serem Analisados p162
- 6.2.5 Preparo para o Campo p164
- 6.2.6 Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras p166

6.3 Análises Laboratoriais p172

6.4 Interpretação dos Resultados e Tomadas de Decisão p172
- 6.4.1 Aspectos Gerais de Controle de Qualidade no Campo p172
- 6.4.2 Controle de Qualidade nas Análises Laboratoriais p174

Anexo I — Parâmetros *In Situ* Recomendados para Monitoramento da Qualidade da Água e Caracterização de Efluentes p175

Anexo II — Demais Parâmetros Recomendados para Monitoramento da Qualidade da Água e Caracterização de Efluentes p176

Anexo III — Modelo de Registro de Cadeia de Custódia p178

Anexo IV — Recipiente da Amostra e Informações de Preservação p180

6.1 Considerações Gerais

A disponibilidade de água, tanto em quantidade como em qualidade, é um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento regional considerando-se tanto o meio urbano como o rural. Pelas características do seu ciclo, a quantidade da água no planeta tem se mantido aproximadamente constante desde a antiguidade. Por isso, tecnicamente, ela não está se tornando escassa, o que ocorre é uma carência da água para atender determinadas demandas que estejam associadas a uma qualidade mínima, respeitada a sua disponibilidade local.

Como a pressão sobre os recursos hídricos tem crescido, principalmente pelo aumento da demanda e de seu uso indevido, o monitoramento da qualidade da água e a caracterização de efluentes tornaram-se fundamentais para verificar o estado de degradação dos recursos hídricos permitindo uma avaliação adequada sobre sua qualidade e subsidiando tomadas de decisão quanto a sua preservação e adequação às exigências da legislação ambiental. Além disso, o objetivo da caracterização de efluentes e monitoramento da qualidade da água é monitorar mudanças na qualidade das condições ambientais no meio receptor e auxiliar na interpretação de dados do monitoramento biológico e dos testes de toxicidade.

As práticas relacionadas ao monitoramento de qualidade de água incluem a coleta de dados e de amostras de água em locais específicos, feita em intervalos regulares de tempo, de modo a acompanhar as alterações nas características físicas, químicas e biológicas decorrentes de atividades antrópicas e de fenômenos naturais. A caracterização de efluentes é conduzida por meio da análise de uma amostra de efluente, geralmente no ponto final de descarga, que fornece informações sobre as concentrações de contaminantes potenciais e demais características físico-químicas.

No que diz respeito à legislação, há diversas regulamentações federais que preveem o uso do monitoramento ambiental sob diferentes enfoques. Por exemplo, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama)

nº 274/2000 (CONAMA, 2000) estabelece padrões de qualidade para a balneabilidade; a Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) define padrões de potabilidade da água; a Resolução Conama nº 357/2005 (CONAMA, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e estabelece diretrizes para seu enquadramento, e a Resolução Conama nº 430/2011 (CONAMA, 2011) estabelece limites e parâmetros de monitoramento para lançamento de efluentes. Entretanto, nenhuma delas faz menção quanto à padronização de métodos a serem utilizados pelos órgãos de controle ambiental.

A intenção deste capítulo é fornecer orientação no que diz respeito à caracterização de efluentes e ao monitoramento da qualidade da água, bem como às estratégias para obter resultados confiáveis e de boa representatividade. A etapa de amostragem é crucial neste processo, pois o material coletado deve representar de forma fidedigna o local amostrado. A seleção criteriosa dos pontos de amostragem e a escolha das técnicas adequadas de coleta e de preservação de amostras são primordiais para a confiabilidade e representatividade dos dados gerados. Neste capítulo, as técnicas e a frequência de amostragem são discutidas, assim como a rotulagem, o transporte e o armazenamento das amostras até o momento das análises. A importância de documentar cada etapa de amostragem também é enfatizada e são fornecidas orientações sobre utilização de livros de registo de campo. Os principais parâmetros físico-químicos são apresentados juntamente com uma breve descrição de sua influência no ambiente.

6.2 Plano de Amostragem

A amostragem é a etapa crucial para o sucesso do monitoramento de um ecossistema aquático, visto que envolve um grande número de variáveis que incluem desde a definição da frequência e dos pontos de coleta até a análise laboratorial e a interpretação dos dados. O objetivo da amostragem e dos ensaios não é a obtenção de informações sobre alíquotas em si, mas a caracterização espacial e temporal do corpo d'água amostrado. Para isso, devem ser considerados elementos como topografia, fontes de contaminação, precipitação atmosférica, temperatura e demais características do ambiente.

Um plano de amostragem exige profundo conhecimento técnico e científico, o que significa contar com recursos humanos altamente treinados e capacitados tanto para a definição dos pontos e para as atividades de

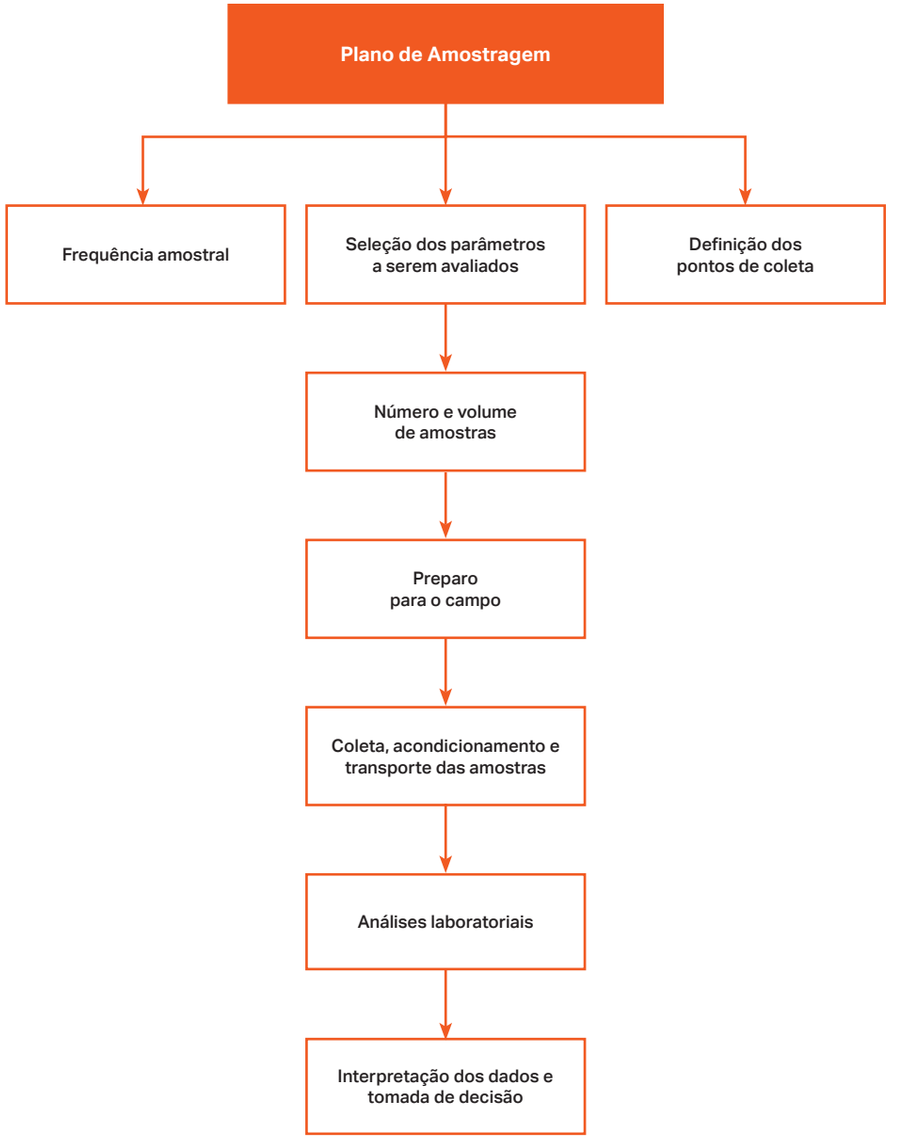


Figura 6.1 Fluxograma apresentando a sequência dos procedimentos de amostragem e análise laboratorial.

campo, visto que a amostra deve ser manuseada de tal forma que nenhuma mudança significativa em sua composição ocorra antes das determinações a serem realizadas. Cabe destacar que a amostragem deve obedecer a uma distribuição uniforme das coletas ao longo do período e à representatividade dos pontos de coleta combinando critérios de abrangência espacial e pontos estratégicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Em determinadas situações os resultados obtidos com a amostragem realizada permitem a identificação de locais onde é necessário um maior detalhamento, caso isso ocorra, o número de amostras para um dado ponto amostral poderá ser alterado e uma revisão do plano de amostragem deverá ser realizada. Lembrando que uma boa amostragem é realizada em pontos estratégicos e permite o acompanhamento da qualidade do ecossistema aquático bem como a identificação de tendências e o apoio à elaboração de diagnósticos. Na Figura 6.1 é apresentado um fluxograma mostrando uma sequência sugestiva de procedimentos que devem ser observados durante a elaboração de um plano de amostragem. Logo em seguida, cada etapa é discutida a fim de facilitar o entendimento de cada procedimento.

6.2.1 Frequência da Amostragem

A caracterização de efluentes e o monitoramento da qualidade da água deverá ser conduzida quatro vezes por ano e ter não menos do que um mês de intervalo entre as amostras. Recomenda-se que, sempre que possível, as amostras para caracterização de efluentes e monitoramento da qualidade da água devem ser recolhidas uma vez em cada trimestre do ano e é recomendado que as amostras para efluentes e água sejam recolhidas no mesmo dia (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Os seguintes fatores devem ser levados em consideração para decidir quando as alíquotas de amostras de efluentes deverão coletados para a caracterização:

- Variabilidade sazonal dos efluentes, com base na composição e fluxo;
- A época do ano em que a amostra anterior foi recolhida;
- A época do ano quando a amostragem para o monitoramento da qualidade da água está sendo conduzida;
- A época do ano quando as concentrações de contaminantes deverão ser mais elevadas na área de exposição.

Para o monitoramento da qualidade da água, os seguintes fatores devem ser levados em consideração para decidir quando amostras de água deverão ser coletadas no meio receptor:

- Variabilidade sazonal na qualidade da água e do fluxo na área de exposição;
- A época do ano em que as concentrações dos contaminantes na região de exposição deverão ser mais elevadas;
- A época do ano em que as amostras do monitoramento anterior foram recolhidas;
- A época do ano em que as amostras para a caracterização de efluentes são recolhidas;
- A época do ano em que o monitoramento biológico será realizado.

6.2.2 Definição dos Pontos de Coleta

Quando se deseja acompanhar a qualidade da água de um corpo hídrico a longo prazo, o posicionamento do local de amostragem deve levar em consideração a existência de lançamentos de efluentes líquidos industriais e/ou domésticos (Figura 6.2), bem como a presença de afluentes na área de influência do ponto de amostragem, pois estes podem alterar a qualidade da água do corpo. Já para definição dos locais de amostragem de efluentes líquidos (industriais e domésticos) e dos corpos hídricos receptores, devem ser considerados os objetivos envolvidos na amostragem tais como: avaliação do desempenho do sistema de tratamento, atendimento aos padrões da legislação, obtenção de informações para elaboração de projeto de sistemas de tratamento de águas residuais, implantação de medidas de prevenção à poluição, entre outros. As amostras para caracterização de efluentes deverão ser realizadas a partir de pontos de descarga final (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

De acordo com Brandão (2011), devido à grande heterogeneidade encontrada nos corpos hídricos alguns fatores deverão ser observados a fim de minimizar as variações encontradas como:

- A estratificação térmica vertical, decorrente da variação de temperatura ao longo da coluna d'água e do encontro de massa de água;
- Zona de Mistura, formada por dois ou mais tipos de águas que estão em processo de mistura (rio logo a jusante da

descarga de um efluente), sendo que a coleta deverá ser realizada após a completa mistura;

- Distribuição heterogênea de determinadas substâncias ou organismos em um sistema hídrico homogêneo. Isso ocorre quando os materiais não dissolvidos, com densidade diferente da água, tendem a ficar heterogeneamente distribuídos.

Recomenda-se que pelo menos três amostras de água deverão ser recolhidas em cada ponto de amostragem para fornecer uma estimativa da variabilidade e determinar se as concentrações dos contaminantes são homogêneas dentro da área de amostragem. No entanto, isto pode não ser suficientemente robusto para avaliar os dados estatisticamente. Mais pontos de amostragem dentro de cada área poderá ajudar a entender melhor as concentrações de contaminantes na área de exposição. No mínimo, uma amostra composta, consistindo de algumas subamostras espaçadas dentro da área de estudo, deverá ser coletada. Nos casos onde haverá coleta de peixes ou bentos, pelo menos uma amostra de água deverá ser recolhida para se ter uma ideia da exposição às substâncias químicas (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

6.2.3 Definição do Número e Volume das Amostras

Um pequeno número de amostras acarreta resultados com baixa precisão, portanto, pouco confiáveis. Paralelamente, se os locais de coleta do sistema não forem apropriadamente escolhidos, a amostra não será representativa da população-alvo e os resultados estatísticos podem ficar seriamente distorcidos. Quanto maior o número de amostras investigadas, melhor será o conhecimento da variabilidade e, consequentemente, da estimativa do impacto ambiental. O volume de amostra colhida deve ser suficiente para permitir a todas as análises e testes físico-químicos e microbiológicos, levando em conta as amostras de controle de qualidade e as repetições necessárias para as análises laboratoriais.

6.2.4 Seleção dos Parâmetros a Serem Analisados

Os parâmetros a serem caracterizados para o monitoramento da qualidade da água ou caracterização de um determinado efluente são descritos na Resolução Conama nº 357/2005 (CONAMA, 2005) de acordo a

Figura 6.2 Visitas a campo para definição dos pontos de coleta do Projeto Peixe Guia realizado no Rio Jucu e no estuário do Rio Santa Maria da Vitória – ES. Dezembro/2013.

classificação dos corpos hídricos. No final deste capítulo são apresentados os principais parâmetros a serem avaliados no corpo hídrico (Anexo 1). Entretanto, o diagnóstico do uso e ocupação do solo na bacia de captação é ferramenta essencial para a identificação dos parâmetros a serem priorizados em um programa de monitoramento. Por exemplo, onde existam atividades agrícolas intensas torna-se essencial realizar a análise de agrotóxicos; em locais com atividades de garimpo, a análise de mercúrio ou outros prováveis metais (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

A medição de alguns parâmetros de efluentes, tais como a condutividade e concentrações de sulfato ou cloreto podem ser úteis como marcadores para determinar a extensão de mistura do efluente na zona de exposição, caso não tenham sido empregados estudos de delineamento de pluma com emprego de corantes. Assim como as concentrações de cálcio, magnésio, cloreto, potássio, sódio, o sulfato e o carbono orgânico dissolvido podem ser utilizadas para estimar a toxicidade potencial de alguns metais, proporcionando, assim, uma medida geral da qualidade da água em locais onde os organismos serão coletados (U.S. EPA, 2007; REILEY, 2007).

6.2.5 Preparo para o Campo

A coleta das amostras é provavelmente a etapa mais importante para a avaliação da área de estudo. Por este motivo é crucial que a amostragem seja realizada com precaução técnica para evitar todas as fontes possíveis de contaminação e de perdas, representando realmente o corpo d'água amostrado. É valido lembrar que o método de coleta irá depender da matriz a ser amostrada (águas superficiais, em profundidade, subterrâneas, sedimentos etc.) e do tipo de amostragem (amostra simples ou composta). Após a definição dos pontos de amostragem, do roteiro da coleta e dos parâmetros selecionados para as análises, alguns pré-requisitos devem ser observados a fim de garantir uma boa amostragem do local escolhido, conforme é descrito abaixo, (ENVIRONMENT CANADA, 2012) e também de acordo com protocolos específicos para as análises que serão realizadas.

- Checar a limpeza e a calibração dos equipamentos que serão utilizados na coleta, inclusive reagentes e soluções que serão utilizadas e o seu prazo de validade;
- Protocolos e procedimentos de coleta devem ser facilmente acessíveis em todos os momentos para garantir o funcionamento adequado e seguro dos equipamentos;
- Formulários e diários de campo devem ser preparados com antecedência para que as notas de campo (Figura 6.3) e os dados possam ser rápida e eficientemente gravados. Formulários extras devem estar disponíveis em caso de um acidente ou perda. Recomenda-se que estes formulários sejam impermeáveis e resistentes ao desgaste;
- Um *kit* de reparação deve acompanhar cada um dos equipamentos em caso de falha ou perda de partes removíveis do equipamento, inclusive pilhas, baterias e soluções de calibração devem estar disponíveis.
  Os equipamentos de amostragem utilizados para medições de campo de parâmetros de qualidade de água devem ser devidamente calibrados ou padronizados de acordo com as recomendações do fabricante;
- Certificar o tipo de recipiente necessário para o armazenamento da amostra com o volume necessário. Recomenda-se utilizar frascos novos, caso seja necessário reutilizar os frascos, checar o procedimento de limpeza recomendado pelo laboratório responsável pelas análises físico-químicas e microbiológicas;
- Os frascos devem ser etiquetados de forma adequada, com uma etiqueta adesiva impermeável. Recomenda-se utilizar caneta de tinta indelével capaz de escrever sobre superfícies molhadas;
- Os recipientes devem ter tampas que permitem uma boa vedação. Recomenda-se utilizar recipientes com forro nas tampas de material inerte (por exemplo, teflon) para evitar possíveis contaminações;
- Um inventário das amostras para rastreamento deve ser preparado com antecedência. Em geral, deverá conter algumas informações básicas como número de identificação, data e hora da coleta, nome do responsável pela coleta, natureza da amostra, identificação do ponto de amostragem, georreferenciamento, condições meteorológicas, medições de campo etc.;
- Checar todo o material de apoio: álcool 70%, luvas descartáveis, caixa térmica, etiquetas, sacos plásticos para acondicionamento dos frascos, tesoura, termômetro etc.;

- As determinações de campo utilizando-se os medidores portáteis ou multiparâmetros devem ser feitas tomando-se alíquotas separadas das que serão enviadas ao laboratório, sendo que os equipamentos devem estar devidamente calibrados;
- Imediatamente após a coleta, as amostras deverão ser identificadas e acondicionadas em caixa térmica com gelo até a chegada ao laboratório;
- É recomendado levar para o campo amostras com água do laboratório (branco amostral) para fins de controle de qualidade, sendo estas submetidas aos mesmos procedimentos de coleta do corpo hídrico. Isto pode ser necessário em ambientes com contaminação significativa do ar ou quando os tempos de manipulação e coleta das amostras são longos ou complicados.

Os devidos cuidados com a conservação das amostras e volume a ser coletado devem ser obtidos no laboratório de referência escolhido para a realização das análises. Geralmente a preservação e o armazenamento das amostras irão depender do tipo de análise, bem como do tipo de frasco e do volume mínimo de amostra. Geralmente é indicado para todas as análises um acondicionamento em frascos de polipropileno ou equivalente, acondicionados em caixas térmicas de no máximo 4ºC, o prazo recomendado para a caracterização é de até 24 horas. Frascos de vidro borossilicato também podem ser utilizados, exceto para a análise de alcalinidade, visto que os metais podem adsorver em suas paredes. Os frascos de polipropileno são inertes para a maioria dos compostos inorgânicos, biológicos e microbiológicos, porém podem contaminar as amostras com ftalatos, ainda assim, são os mais recomendados.

6.2.6 Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras

Os parâmetros de qualidade da água a serem avaliados em campo são oxigênio dissolvido (OD), pH, condutividade e temperatura, além de Potencial de Oxidação/Redução (ORP) e salinidade indicados em amostras de estuários. A profundidade de onde a amostra foi recolhida, a transparência óptica e o fluxo de corrente também devem ser medidos no campo.

As medições de parâmetros *in situ* podem ser tomadas diretamente na água ou a partir de um recipiente da amostra no barco ou em terra

Figura 6.3 Formulário padronizado utilizado para as anotações de campo tomadas durante as coletas de água e sedimento do Projeto Peixe Guia.

imediatamente após a coleta da amostra, desde que o material seja coletado na profundidade apropriada. Se as medições de oxigênio dissolvido forem realizadas na praia ou em água com grande turbulência, deve-se tomar cuidado especial para garantir que o ar não seja introduzido na amostra. Abaixo estão descritas algumas recomendações quanto a profundidade adequada para coleta:

- Em corpos d'água superficiais ≤ 2 m de profundidade, os parâmetros de padrão de qualidade da água devem ser medidos em profundidade média, em geral 15 cm abaixo da superfície;
- Se a profundidade variar de 2 a 4 m, as medições da qualidade da água normalmente devem ser realizadas em 2 intervalos de profundidade: cerca de 25 cm acima do fundo e 25 cm abaixo da superfície;
- Em corpos de água mais profundos, as medições devem ser tomadas ao longo da coluna de água. Informações sobre perfis de profundidade e de fundo da coluna de água de condutividade, pH, dureza, alcalinidade, salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido devem ser obtidas ao longo de intervalos de 1 a 5 m (dependendo da profundidade total). Por exemplo, a uma profundidade de 5 m, medições devem ser tomados a cada metro. A uma profundidade de 25 m, as medições devem ser registradas em intervalos de 5 m;
- Para amostras profundas, um amostrador peristáltico, com tubulação de teflon, deve ser utilizado em detrimento de outros tipos de bombas. Se forem utilizados outros tipos, eles devem obrigatoriamente ser de revestimento não metálico e inerte (Figura 6.4). A amostragem deve proceder a partir do ponto menos contaminado para o ponto mais contaminado. As lavagens deverão ser realizadas com ácido nítrico diluído e água destilada entre as coletas. O enxágue dos coletores deverá ser recolhido e devolvido para o laboratório para o devido descarte. O branco controle dos amostradores deverá ser executado antes e após o uso para demonstrar que nenhuma contaminação é transmitida para amostras (FOWLIE; HART; TURLE, 2001).

Figura 6.4 Garrafa de Van Dorn utilizada para coleta de água em diferentes profundidades. Amostra coletada sendo acondicionada em frasco devidamente etiquetado.

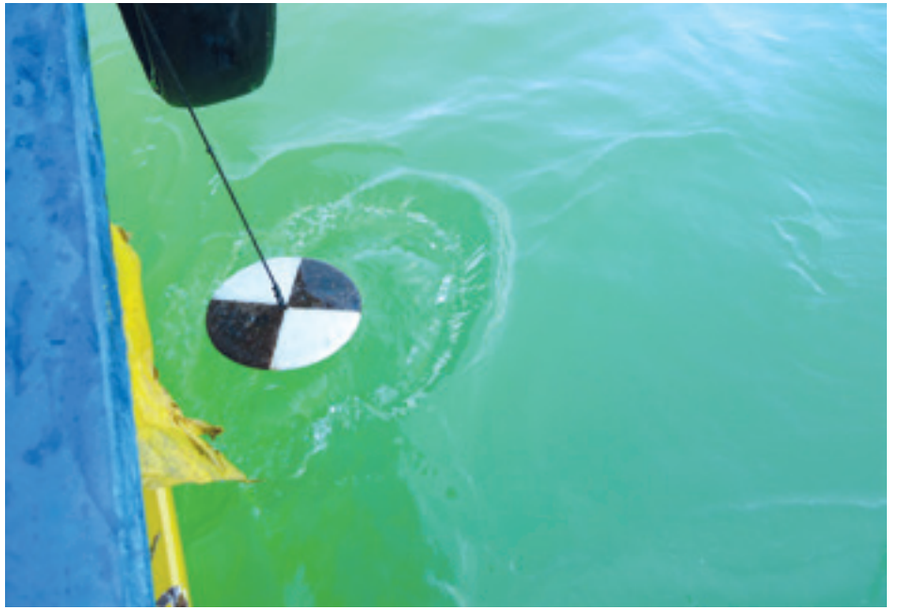


Figura 6.5 Disco de Secchi.

A caracterização dos perfis de águas mais profundas pode ser facilitada através da utilização de um registador de dados (ou equivalente) equipado com uma sonda de oxigénio dissolvido, pH, condutividade, profundidade e sonda de temperatura, que avaliam a qualidade da coluna de água simultaneamente. Este tipo de equipamento é particularmente útil para avaliações mais profundas (> 50 m) e durante o manuseio, o operador é capaz de avaliar visualmente os dados de entrada, observando áreas específicas de interesse durante a descida e subida da unidade. Essas informações são registradas manualmente ou diretamente armazenados no registrador de dados. Para complementar os registos de dados, leituras de parâmetros devem ser registrados manualmente em folhas de dados de campo (a cada 2 ou 5 m), dependendo da profundidade total ou do perfil desejado (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Em profundidades rasas, medidores portáteis são muitas vezes a maneira mais conveniente de medir parâmetros de qualidade da água *in situ*. Eles são leves e vários modelos estão disponíveis podendo medir uma variedade de parâmetros, porém estas unidades portáteis possuem uma limitação da sua utilização pelo comprimento das sondas, que pode variar de 2 a 5 m de comprimento. Estes medidores tendem a exigir mais na manutenção regular e em calibração, o que significa que um cuidado especial deve ser tomado para certificar-se de que os medidores estão em funcionamento adequado.

A profundidade óptica é uma medida da transparência da água e pode ser medido com um medidor de turbidez no laboratório ou no campo, utilizando um disco de Secchi (Figura 6.5). O disco tem 20 cm de diâmetro e é pintado de branco em dois quadrantes opostos e preto nas outras duas. O disco é acoplado a uma fita calibrada e para medir a profundidade óptica, o disco é baixado para dentro da água até que a sua sombra tenha desaparecido. Ele é então levantado lentamente e a profundidade da água na qual ela reaparece é gravada. Pelo menos duas medições devem ser feitas em cada ponto amostral e a profundidade óptica deve ser estimada com base no valor médio dos resultados. As medições devem ser realizadas idealmente ao meio-dia e óculos de sol não devem ser utilizados durante as medições (NIELSEN; JOHNSON, 1983).

Na Tabela 6.1 a seguir encontra-se listado um resumo de recomendações e orientações de como realizar o acondicionamento, preservação e armazenamento das principais análises físico-químicas da amostra. Informações adicionais sobre armazenamento e preservação de amostras podem ser obtidas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

Tabela 6.1 Armazenamento e preservação de amostras para análises físico-químicas.

Ensaio		Preservação	Armazenamento	Validade
Alcalinidade	PP	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	24h
Cloreto, Nitrato, Nitrito, Sulfato	PP	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	Cloreto e Sulfato 28 d Nitrito e Nitrato 24h
Condutividade	PP ou VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	28 dias
Cor, Turbidez	PP ou VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	48 h
Metais, semimetais e Dureza	-	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	6 meses Mercúrio – 28 dias
Ortofosfato	PP ou VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	48h
Oxigênio Dissolvido (Método de Winkler)	PP	1mL sulfato Manganoso + 1mL azida sódica	Não requerido	48h
Oxigênio Dissolvido (em campo)	-	-	-	Ensaio Imediato
Fósforo Total, Nitrogênio Total	PP	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	6 meses
Odor	VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	24 h
pH (em campo)	-	-	-	Ensaio imediato
Salinidade	PP	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	6 meses
Série Sólidos*	PP ou VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	7 dias
Sólidos Sedimentáveis	PP ou VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	24 h
Turbidez	-	-	-	Ensaio Imediato
Carbono Orgânico Total e Dissolvido	VB	Acidificar com HCl 1N até pH<2	Resfriamento a 4ºC	7 dias
DBO (demanda Bioquímica de Oxigênio)	PP ou VB	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	48 h
DQO (Demanda Química de Oxigênio)	PP ou VB	Acidificar com H2SO4 1N até pH<2	Resfriamento a 4ºC	7 dias
Óleos e Graxas	VA	Resfriamento em gelo	Resfriamento a 4ºC	28 dias

PP – Polipropileno; VB – Vidro Borosilicato, VA – Vidro Âmbar

6.3 Análises Laboratoriais

Todas as amostras devem ser armazenadas durante o menor intervalo de tempo possível, em condições que minimizem a degradação da amostra, devendo estas serem transportadas para um laboratório logo que possível após a coleta (dentro de 24 a 48 horas no máximo). As análises devem ser realizadas nos tempos de armazenamento aceitas de acordo com o ensaio. As amostras devem ser mantidas a temperaturas acima do seu ponto de congelação e abaixo de 10º C com uma exposição mínima à luz. As amostras digeridas para a análise dos metais podem ser mantidas num recipiente selado e analisadas dentro de 30 dias. Para obter informações adicionais consulte Fowlie, Hart e Turle (2001).

Os métodos de amostragem utilizados para o monitoramento dos parâmetros deverão estar em consonância com as normas nacionais ou, na falta dessas, os métodos padronizados para determinação da maioria dos parâmetros de qualidade de água e águas residuárias estão coletados no livro de referência Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, editado em conjunto pela American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). Para maiores detalhes dos métodos descritos, deve-se consultar esse compêndio.

6.4 Interpretação dos Resultados e Tomadas de Decisão

A interpretação dos resultados e as tomadas de decisão deverão ser feitas por pessoal tecnicamente capacitado, com conhecimento e experiência em todas as etapas discutidas neste capítulo. A qualidade dos resultados obtidos depende de um rigoroso controle de qualidade na etapa de campo e nas análises laboratoriais.

6.4.1 Aspectos Gerais de Controle de Qualidade no Campo

O Controle de Qualidade no monitoramento da qualidade da água e na caracterização de efluentes poderá ser alcançado através de diversas metodologias, incluindo leituras em duplicatas, comparação de leituras com padrões conhecidos, coleta de amostras para avaliação analítica etc. Os problemas mais comuns de qualidade são resultados de rotulagem indevida, não adição de conservantes adequados, contaminação da amostra ou mesmo excedendo o tempo de espera durante a preservação. Cada amostra deve ser claramente rotulada de uma forma que identifica a amostra e a distingue de todas as outras. As etiquetas devem ser preenchidas com tinta indelével e fixas no recipiente de tal forma que não caia mesmo quando molhado ou durante o transporte (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

O diário de campo é uma parte integral do programa de amostragem e forma a base do relatório de amostragem. Itens documentados no diário de campo são muitas vezes relevantes para a interpretação de dados laboratoriais. Quaisquer desvios do plano de amostragem ou qualquer outra observação sobre a amostra ou sobre os locais de amostragem também devem ser registrados no diário de campo.

Abaixo são listados alguns aspectos gerais do controle de qualidade que deverão ser observados (ENVIRONMENT CANADA, 2010 e 2012):

- Todo o pessoal envolvido nos processos de campo deverá ter a formação adequada;
- Os métodos de amostragem deverão ser aplicados de forma consistente entre os locais ao longo do estudo;
- As amostras devem ser recolhidas de acordo com procedimentos operacionais padronizados que devem estar disponíveis para o pessoal em todos os momentos durante o estudo de campo;
- Os equipamentos de amostragem deverão ser apropriados para o *habitat* em estudo, devidamente limpos e acompanhados da documentação adequada (ou seja, manual, calibração e programação de manutenção);
- Todas as amostras devem ser devidamente marcadas com data, local, tipo, número e nome do coletor;
- As amostras devem estar no recipiente adequado com o conservante apropriado ou agente fixador, se necessário;
- Os técnicos de campo devem manter notas de campo detalhadas usando tinta indelével e cadernos impermeáveis;
- O pessoal deve seguir os métodos de transporte e armazenamento adequados;
- Formulários padronizados de coleta de campo devem ser utilizados durante o programa de campo.

6.4.2 Controle de Qualidade nas Análises Laboratoriais

O controle de Qualidade do Laboratório onde serão realizadas as análises abrange práticas de gestão e técnicas destinadas a garantir a confiabilidade dos dados obtidos e a robustez dos métodos utilizados. Atividades de controle de qualidade incluem auditorias internas regulares e também auditorias externas no caso de credenciamento. Em todos os casos, boas práticas de laboratório (BPL) bem estabelecidas devem ser seguidas. Abaixo, segue uma breve listagem das práticas de laboratório recomendadas — uma descrição de BPL pode ser encontrado em maior detalhe na Environmental Laboratory Approval Program (ELAP) 1988:

- Registros sobre preparação de reagentes devem ser mantidos em formulário. Recipientes de reagentes preparados devem ser rotulados com o nome do reagente, data de elaboração, prazo de validade e a pessoa responsável;
- Os equipamentos devem ter manutenção regular. Registros de manutenção devem ser mantidos em formulário;
- Instruções escritas devem estar disponíveis para todos os equipamentos;
- A pureza da água utilizada no laboratório deverá ser documentada. Água destilada/deionizada deve ser verificada em um medidor de condutividade diariamente;
- Os reagentes químicos deverão satisfazer as exigências de pureza de cada método analítico;
- Reagentes e solventes devem ser armazenados de acordo com as instruções do fabricante;
- Os reagentes devem ser preparados e padronizados em relação a padrões primários de referência;
- As temperaturas de todos as geladeiras e incubadoras devem ser verificadas diariamente e serem registradas;
- O pessoal do laboratório deve ter uma formação adequada para os procedimentos laboratoriais de análise.

Anexo I — Parâmetros *In Situ* Recomendados para Monitoramento da Qualidade da Água e Caracterização de Efluentes

pH O pH muitas vezes determina a solubilidade de espécies metálicas e, por conseguinte, está associada à toxicidade do efluente. Extremos de pH são conhecidos por serem tóxicos para os organismos aquáticos (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

ORP O ORP é o Potencial de Óxido-Redução (*Oxi-Reduction Potential*). É um indicativo da qualidade da água, sendo uma medida em milivolts, que é diretamente ligada ao pH e representa qual a tendência de reações químicas do meio aquoso, por exemplo podendo indicar a formação de nitritos, nitratos, denitrificação etc. (CETESB, 2001).

Salinidade A salinidade refere-se à quantidade total de sais minerais dissolvidos na água. Níveis muito elevados deste parâmetro podem afetar significativamente o metabolismo de várias espécies vegetais e animais pelo desequilíbrio osmótico. A salinidade também é um importante parâmetro em ambientes marinhos (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Turbidez Turbidez é a redução da transparência de uma amostra aquosa devido a presença de material em suspensão, tais como argila, silte, matéria orgânica e inorgânica, plâncton etc. É medida por turbidímetro e expressa em NTU (unidade nefelométrica) (CETESB, 2001).

Temperatura As mudanças de temperatura podem afetar as propriedades limnológicas de lagos, os organismos aquáticos e também podem afetar a solubilidade do oxigênio na água (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Oxigênio Dissolvido O oxigênio dissolvido é um componente essencial para o metabolismo dos microrganismos aeróbios presentes em águas naturais, sendo indispensáveis para os seres vivos, especialmente para os peixes, os quais geralmente não resistem a concentrações inferiores a 4,0 mg/L (KEGLEY; ANDREWS, 1988).

Condutividade Elétrica A condutividade elétrica se refere à capacidade de uma solução aquosa possui de conduzir corrente elétrica. Esta capacidade depende basicamente da presença de íons, da concentração

total, mobilidade, valência, concentrações relativas e medidas de temperatura. A condutividade pode indicar o grau de mineralização da água e indicação rápida de variações nas concentrações de minerais dissolvidos (APHA, 2005).

Transparência óptica A profundidade óptica é uma medida domínio da transmissão da luz através da água em função da cor de água (constituintes dissolvidos) e turbidez (partículas constituintes). A profundidade óptica é medida em campo utilizando um disco de Secchi. Um baixo nível de transmissão de luz pode reduzir a produtividade primária na água e reduzir a capacidade de predadores para encontrar presas. Também é um parâmetro que indica a qualidade estética de um corpo hídrico (APHA, 2005).

Profundidade do corpo d'água A profundidade da água pode afetar a temperatura, oxigênio dissolvido e o grau de diluição do efluente, todos os quais são fatores que modificam a toxicidade dos efluentes (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Anexo II — Demais Parâmetros Recomendados para Monitoramento da Qualidade da Água e Caracterização de Efluentes

Alcalinidade A alcalinidade é uma medida da capacidade de tamponamento da água e dá uma indicação de como a água é sensível a mudanças no pH, além de ser um fator que afeta o destino e a biodisponibilidade dos metais (APHA, 2005).

Compostos nitrogenados (amônia e nitrato) Os compostos de azoto podem ser tóxicos para os organismos aquáticos e além disso, pelo fato de serem nutrientes, podem levar a um crescimento excessivo de plantas (eutrofização). O crescimento das plantas em excesso pode levar a depleção de oxigênio, resultando na mortandade de peixes (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Dureza A dureza da água é uma medida de cátions, predominantemente cátions divalentes, dissolvidos em água. O cálcio e o magnésio são os principais contribuintes para este ensaio, a dureza pode ser calculada com base nas concentrações desses íons. A dureza também é um fator importante que afeta o destino, a biodisponibilidade e a toxicidade de metais (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Cloreto Os íons cloreto podem afetar a toxicidade de metais e/ou outros parâmetros nos efluentes, além de ajudar na interpretação dos potenciais impactos causados pelos metais. Em águas residuais que contêm esgotos sanitários, as concentrações ultrapassam 15 mg/L (CETESB, 2001).

Fósforo Total O fósforo total é um nutriente e pode levar a um crescimento excessivo de algas e plantas (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Sólidos em Suspensão Sólidos em suspensão podem matar os peixes por entupimento de suas brânquias e afetar o seu *habitat*, contaminando os sedimentos ou reduzindo a penetração da luz em águas receptoras (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Série Sólidos Dissolvidos Totais É o conjunto de todas as substâncias orgânicas e inorgânicas contidos na amostra sob forma molecular, ionizada ou micro granular. É um parâmetro de qualidade de um corpo hídrico, pois avalia o percentual total dos constituintes minerais presentes na água por unidade de volume (APHA, 2005).

Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) A demanda bioquímica e química de oxigênio são parâmetros para identificar a presença da matéria orgânica na água. Ambos indicam a demanda ou o consumo de oxigênio necessário para estabilizar a matéria orgânica presente na água, sendo a DBO necessária para a oxidação bioquímica e a DQO corresponde a oxidação química. Ambos são expressos em mg/L (PARRON, 2011).

Carbono Orgânico Total (COT) O COT é obtido pela oxidação do carbono, portanto é uma medida direta da diversidade de compostos orgânicos em vários estados de oxidação em uma amostra de água e, por isso, é um bom indicador da qualidade de água. O Carbônico Orgânico Total pode ser dividido em frações de Carbono Orgânico Dissolvido, Não Dissolvido, Volátil e Não Volátil (PARRON, 2011).

Anexo III — Modelo de Registro de Cadeia de Custódia

Informações Gerais

Empresa
Responsável
Endereço
Telefone
E-mail

Informações do projeto

Projeto
Cotação
Local
Responsável
Amostrado por

Tempo Necessário

( ) 5 — 7 dias (padrão)
( ) 3 — 4 dias
( ) 2 dias
( ) 1 dia
( ) Mesmo dia
Data solicitada
Confirmação de urgência

Critério de Regulação

ÁGUA DOCE
( ) Especial
( ) Classe 1
( ) Classe 2
( ) Classe 3
( ) Classe 4
ÁGUA SALOBRA / SALINA
( ) Especial
( ) Classe 1
( ) Classe 2
( ) Classe 3
( ) Outra a especificar

Para uso exclusivo do laboratório

	SIM	NÃO	ID FREEZERS (Temp.ºC)				RECEPÇÃO
Presença de lacre	S	N					
Lacre intacto	S	N					
Resfriamento médio	S	N					
Presença de lacre	S	N					
Lacre intacto	S	N					
Resfriamento médio	S	N					
Presença de lacre	S	N					
Lacre intacto	S	N					
Resfriamento médio	S	N					

Análises Solicitadas

Instruções especiais

Identificação de amostra	PROFUNDIDADE	DATA	TEMPO	MATRIZ	QUANTIDADE			BETEX F1 ( ) COV ( )	BETEX F1-F2	ANÁLISES DE ROTINA	METAIS TOTAIS ( ) DISS ( )	MERCÚRIO TOTAL ( ) DISS ( )	SALINIDADE	GRANULOMETRIA	TEXTURA (AREIA, SILTE, ARGILA)					Espere, não analise	
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
INDICAR: Filtrada (F) Conservada (C) Ambos (F, C) ▸																					

ENTREGUE POR (ASSINATURA)	DATA (DD.MM.AA)	HORÁRIO (HH:MM)	RECEBIDO POR (ASSINATURA)	DATA (DD.MM.AA)	HORÁRIO (HH:MM)	OBSERVAÇÕES

Anexo IV — Recipiente da Amostra e Informações de Preservação

As amostras devem ser mantidas a baixas temperaturas (< 10ºc) durante a amostragem até a entrega ao laboratório responsável

Água

	ANÁLISES	FRASCOS	PRESERVAÇÃO	CORES	TEMPO DE ESPERA[2]
Inorgânicos	Análises de rotina[1]	500mL P	Nenhuma	N/A	7 dias
		125mL P (Metais Dissolvidos)	Filtração no campo 1mL HNO3 50%[4]	Vermelho	6 meses
	pH, EC, Cor, Ortho-PO_4, Acidez, NO_2, NO_3	500mL P	Nenhuma	N/A	7 dias
	Anions, Carbono Inorgânico Dissolvido e Total, F, Sílica, Brometos, Aminas	500mL P	Nenhuma	N/A	14 dias 28 dias (Aminas)
	Cloro (Livre/Total) Cloraminas	250mL P	Nenhuma	N/A	Imediato[6]
	Cloretos	150mL P	1.5mL EDA[4]	N/A	14 dias (preservado) Imediato[6] (Não-preservado)
	STD ou SST ou TURB / (*STD+SST+TURB*)	250mL P / (500mL P)	Nenhuma	N/A	7 dias
	NTK, COD, NH_4, P Total, COT / COD[3]	250mL P	2mL H2SO4 50%[4]	Amarelo	28 dias
	Metais (Multi-elementar)[3]	125mL P	1mL HNO3 50%[4]	Vermelho	6 meses
	Mercúrio[3]	100mL V	1mL HCl 50%[4]	N/A	28 dias
	Manganês 2+	250mL P	1mL de HCl 50%[4]	Azul	14 dias
	Crômio Hexavalente — Cr (VI)[3]	60mL P	1mL NaOH 10N[4]	N/A	28 dias
	Ferro (Férrico-Fe3+ / Ferroso-Fe2+)	250mL VA	Filtração no campo 10mL HCl 50%[4]	N/A	48 horas
	Fenóis	100mL VA	2mL H2SO4 50%[4]	Amarelo	28 dias
	Cianetos	125mL P	1mL NaOH 10N[4]	Roxo	14 dias
	Sulfetos	250mL P	1mL NaOH 10N & 1mL ZnAc 2N[4]	Verde	7 dias
	Sulfitos	125mL P	1.25mL de glicerol[4]	N/A	28 dias (preservado) Imediato[6] (Não-preservado)
	E. coli, Coliformes Totais e Fecais, Bac Red. Sulf[5], Contagem de Bac. Heter.	250mL P	Tiossulfato de sódio[4]	N/A	24 horas
	Demanda Biológica de Oxigênio — DBO	500mL P	Nenhuma	N/A	48 horas
	Oxigênio Dissolvido — OD	300mL V	MnSO4/Iodeto alcalino Não deixar espaço vazio no frasco	N/A	24 horas
	Clorofila *a*	1L P	Evitar exposição à luz	N/A	24 horas
		Membrana de nitrato de celulose envolvido com papel alumínio	Filtração no campo e congelamento[7]	N/A	30 dias

Orgânicos	F2, F2-F4, PAH	2 x 100mL VA	NaHSO4[4]	N/A	14 dias
	Fenóis Semivoláteis, Herbicidas	1L VA	Nenhuma	N/A	7 dias
	COVs, BTEX, F1, THM	2 x 44mL V	NaHSO4[4]	N/A	14 dias
	Sulfolanos	2 x 500mL V	NaHSO4[4]	N/A	14 dias
	PCB	2 x 500mL V	Nenhuma	N/A	7 dias
	Ácidos Naftênicos, HCB	2 x 250mL VA	Nenhuma	N/A	14 dias
	Álcool, Glicol	2 x 44mL V	NaHSO4[4]	N/A	14 dias
	Inflamáveis	3 x 44mL V	Nenhuma	N/A	7 dias
	OGIR / TPHIR / OGH (Gravimetria)	250mL VA	1mL H2SO4 50%[4]	Amarelo	14 dias

Sedimentos

	ANÁLISES	FRASCOS	PRESERVAÇÃO	TEMPO DE ESPERA[2]
Inorgânicos	Salinidade, Metais, Mercúrio, pH, EC, Ânions, NTK, COT e NH4	1L (saco)	N/A	6 Meses 28 Dias (Mercúrio)
	Textura, granulometria	1L (saco)	N/A	N/A
	Combustão Espontânea	2 x 1L (saco)	N/A	N/A

Orgânicos	COVs	1 x 125mL	Sem espaço no frasco	14 Dias
	BTEX / F1	1 x 125mL	Sem espaço no frasco	7 Dias
	F2-F4, PAH	1 x 125mL	N/A	14 Dias
	Orgânicos Semivoláteis	1 x 125mL	N/A	14 Dias
	TCLP BTEX	1 x 125mL	Sem espaço no frasco	14 Dias
	Inflamáveis	1 x 125mL	Sem espaço no frasco	7 Dias
	TCLP, BTEX, Inflamáveis, pH, Metais pesados	2 x 125mL 1 x 1L (saco)	Sem espaço no frasco	7 Dias (Inflamáveis)

Tipos de Frascos

VA	Vidro Âmbar
V	Vidros
P	Plástico

Notas

1	Análises de Rotina: Alcalinidade, HCO3, CO3, pH, EC, OH, Ìons (Ca, Mg, Na, K), Fe, Mn, Cl, SO4, NO2, NO3, STD (Calc.), Dureza (Calc.)
2	Baseia no tempo de retenção mais curto do grupo quando listado em análises múltiplas
3	Requer filtração antes de encher o recipiente da amostra. Se a filtração no campo não for possível, levar amostra extra. Lembrar de remover conservantes dos frascos.
4	O conservante é pré-carregado no frasco.
5	Fornecer dois frascos, no caso de ser necessário várias análises.
6	As análises deverão ser realizadas com maior brevidade possível assim que chegar ao laboratório.
7	Volume de amostra filtrada necessária (mínimo 1L).

Observação

Nota: amostras com requisitos de frascos semelhantes poderão ser compartilhadas no mesmo frasco, desde que exista amostra suficiente para o mínimo necessário para todos os testes solicitados.

7 Ensaios ecotoxicológicos crônicos

Adriana Regina Chippari Gomes
Joanne Louise Parrott

7.1 Ensaios Ecotoxicológicos p187

7.2 Organismos Teste p187

7.3 Tipos de Ensaios Ecotoxicológicos: Agudo e Crônico p188

7.4 Interferências na Toxicidade dos Agentes Tóxicos p192

7.5 Padronização dos Ensaios Ecotoxicológicos Crônicos p193

7.6 Procedimentos para a Realização de Ensaios Crônicos p193

- 7.6.1 Locais de Amostragem p194
- 7.6.2 Coleta das Amostras p194
- 7.6.3 Ensaio Crônico p195
- 7.6.4 Validação, Tabulação e Interpretação dos Dados Obtidos nos Ensaios de Toxicidade p196

7.7 Avaliação de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia* segundo ABNT NBR 13373:2005 p197

7.1 Ensaios Ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos tem a finalidade de identificar a toxicidade de substâncias químicas, de efluentes industriais e de amostras ambientais complexas (água ou sedimento) (COSTA *et al.,* 2008) aos seres vivos. Estes ensaios são realizados em sua grande maioria em condições laboratoriais, muito embora alguns possam ser realizados em campo.

Além de serem usados para a determinação da toxicidade de substâncias isoladas e/ou combinadas em laboratório, com a finalidade de se avaliar o impacto dessas substâncias sobre determinados organismos da biota aquática, são também utilizados como ferramentas importantes nos estudos Monitoramento de Efeitos Ambientais (MEA). Isto porque os estudos de monitoramento tradicionais no Brasil baseiam-se, principalmente, em análises dos parâmetros físico-químicos da água tais como pH, temperatura, oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), dureza, nitrito, fosfatos, além de sólidos em suspensão, presença de metais, de organoclorados e outros. No entanto todas essas análises são medidas "passageiras" e não levam em consideração o que as alterações nestes parâmetros/concentrações podem ocasionar sobre a biota aquática que, em sua maioria, são residentes do ambiente em estudo e consequentemente refletem com veracidade a história das condições ambientais do local onde vivem.

7.2 Organismos Teste

A escolha do organismo teste mais adequado para a realização de ensaios ecotoxicológicos depende de algumas premissas, como revisado por Domingues e Bertoletti (2006) e Costa *et al.* (2008): a espécie deve ter ampla distribuição geográfica, ser abundante no local do biomonitoramento, deve ser sensível a várias substâncias, os indivíduos a serem testados devem ter uniformidade e estabilidade genética, ser um grupo com representatividade

de seu nível trófico, ser de fácil cultivo e de fácil adaptação às condições laboratoriais, além de terem importância econômica.

O mais adequado em estudos de MEA é o uso de diferentes espécies como organismo teste (Figura 7.1) e não usar apenas uma só, pois os resultados obtidos em ensaios ecotoxicológicos para uma espécie raramente podem ser extrapolados para outras. Por isso, recomenda-se o uso de várias espécies pertencentes a diferentes níveis tróficos: produtores (por exemplo, algas), consumidores primários (por exemplo, microinvertebrados) e consumidores secundários (por exemplo, peixes); a fim de que, com base nos resultados da espécie mais sensível, seja possível garantir com mais eficiência o impacto do contaminante no corpo d'água receptor (COSTA *et al.*, 2008; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015). Ainda, de acordo com vários autores, diferentes grupos de organismos indicam, de forma distinta, os efeitos da poluição, com alterações que compreendem desde o grau de sobrevivência até uma mudança comportamental, passando por vários níveis fisiológicos (ROSENBERG; RESH, 1993).

De acordo com a Resolução Conama nº 430/2011, Art. 18, parágrafo 1º (CONAMA, 2011): "Os critérios de ecotoxicidade (...) devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes".

Os organismos aquáticos amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos são as algas, os invertebrados e os peixes. No Brasil, em ensaios marinhos, muito se tem usado os misidáceos (*Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile*), os ouriços do mar (*Lytechinus variegatus* e *Echinometra luconter*), a ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e a alga (*Skeletonema costatum*). E em ensaios realizados com organismos aquáticos de águas continentais são usados como organismo teste: os microcrustáceos, (*Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*), as algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulagaris*, *Anabaena flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa*) e várias espécies de peixes (*Pimephales promelas* e *Danio rerio*).

Os invertebrados e os peixes aquáticos possuem como via de entrada de contaminantes, as brânquias e o sistema gástrico. A importância relativa destas rotas de captação difere entre organismos e compostos químicos e depende das condições ambientais (WALKER *et al.*, 2001).

7.3 Tipos de Ensaios Ecotoxicológicos: Agudo e Crônico

Os ensaios ecotoxicológicos desenvolvidos em condições laboratoriais para espécies representativas da coluna d'água e do sedimento classificam-se basicamente em dois tipos: ensaios agudos (de curta duração) e os ensaios crônicos (de longa duração). Estes ensaios diferenciam-se entre si principalmente pelo tempo de exposição em relação ao tempo de vida do organismo teste, pela concentração do composto tóxico testado e pelo tipo de resposta observada nos organismos testes.

Ambos os tipos de ensaios podem ser conduzidos em diferentes frascos-testes: tubos de ensaio, béqueres, cubas de vidro, aquários e outros. As amostras testadas podem ser substâncias químicas, efluentes e extratos aquosos, sendo sempre acompanhadas de um grupo controle (água sem presença de contaminante) a fim de se garantir as condições experimentais. Premissas da qualidade da água devem ser seguidos durante todo o período de execução dos ensaios, tais como a manutenção do pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza da água etc. Muitos destes parâmetros foram padronizados para a condução de alguns ensaios com as espécies bioindicadoras mais usadas, como *Daphnia similis* (ABNT, 2004a – ensaio agudo) e *Ceriodaphnia dúbia* (ABNT, 2005a – ensaio crônico) (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Os ensaios agudos possuem duração máxima de 96h, podendo durar 24 ou 48h. Nestes ensaios são observados principalmente a mortalidade ou imobilidade dos organismos teste. Os ensaios agudos podem ser definidos como aqueles de respostas rápidas e severas provocadas por uma substância química ou efluente em um curto período de exposição. Os resultados obtidos normalmente são expressos como CL_{50} ou CE_{50}, os quais indicam qual é a concentração média letal ou efetiva, respectivamente, que causam mortalidade ou imobilidade em 50% dos organismos testados em um curto período de tempo. A obtenção desses valores usualmente é calculada por meio de programas estatísticos específicos da área de ecotoxicologia, como o TOXSTAT®. Estes ensaios agudos normalmente são realizados testando cinco concentrações da substância. De uma forma geral, são ensaios de simples realização e de baixo custo.

Os efeitos agudos são observados na natureza quando situações de sinistros ocorrem, como por exemplo rompimento de tubulações, derramamentos de petróleo, lançamento inadequado de efluentes de industrias sem tratamento prévio, aplicações excessivas e incorretas de agrotóxicos, entre outros.

Os ensaios crônicos possuem durações mais prolongadas do que os ensaios agudos, isso por que, neste caso, são avaliados efeitos mais sutis causados por agentes tóxicos durante todo ciclo de vida de uma espécie ou ainda em parte do ciclo de vida do organismo testado. Para que isso seja possível os organismos testes são expostos a concentrações baixas do

contaminante, onde serão analisados efeitos de longo prazo, como crescimento e reprodução, a fim de subsidiar dados de relevância ecológica maior com relação ao potencial de risco de determinadas substâncias tóxicas para a biota aquática.

Muitos dos resultados obtidos neste tipo de ensaio são representados como CEO (Concentração de efeito observado) e Ceno (Concentração de efeito não observado), os quais representam a primeira concentração do agente tóxico ou efluente onde é observado efeito tóxico sobre o organismo testado e a última concentração em que efeitos tóxicos ainda não são observados respectivamente. Com base nestes dois resultados é possível ainda calcular o Valor Crônico: VC (média geométrica entre os valores de CEO e Ceno); Valor Crônico Estimado: VCest (concentração nominal do agente químico que não causa efeito expressivo na sobrevivência e crescimento de larvas ao final do ensaio e é calculada multiplicando-se o fator 0,3 pela CL15;168h), definido na ABNT-NBR 15499/2007 (ABNT, 2007).

Os ensaios crônicos foram desenvolvidos em função de que no ambiente natural não necessariamente são lançados nos corpos hídricos concentrações letais de um determinado agente tóxico. O que comumente ocorre é a liberação rotineira de concentrações subletais que, ao longo do tempo, podem trazer danos graves à saúde da biota aquática, alterando inicialmente respostas individuais dos organismos (nos níveis celulares), avançando para danos na reprodução e sobrevivência, atingindo, por fim, os níveis de populações e da comunidade daquele local.

Segundo Aragão e Araújo (2006) os ensaios crônicos são subdivididos em três categorias:

- Ciclo de vida total: realizado com organismos teste de ciclo de vida rápido, como algas e alguns microcrustáceos. Estes ensaios iniciam-se na fase de ovo e vão até a fase reprodutiva, podendo durar alguns ciclos reprodutivos, como os ensaios realizados com o microcrustáceo *Ceriodaphinia dubia*, que têm duração de sete dias (ABNT, 2005a e 2014). Neste tipo de ensaio, várias concentrações do agente tóxico são testadas com o objetivo de determinar uma faixa de concentrações que causam alterações no crescimento, na reprodução e na sobrevivência do organismo teste;
- Ciclo de vida parcial: realizado com as fases iniciais de vida dos organismos testes, como ovo, larva e/ou juvenil, visto que estas fases são as mais sensíveis ou críticas dos organismos. Neste caso, também são testadas várias concentrações do agente tóxico e, com base nos resultados obtidos, poderá ser feita uma extrapolação para aferir os efeitos sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos testes;
- Ensaios funcionais, neste caso testes com durações menores, como de 7 ou 30 dias por exemplo, podem ser executados em qualquer fase de vida dos organismos testes. Visto que nestes ensaios outras análises de relevância ecológica menores são avaliadas, como alterações nos níveis moleculares, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos. Esses tipos de análises são usados como respostas de advertência iniciais dos organismos testes expostos a concentrações subletais do agente tóxico que, no caso dessa condição persistir por mais tempo, poderá, sim, levar a respostas de relevância ecológica maiores, afetando o crescimento, a reprodução e a sobrevivência da espécie.

Existem três sistemas em que os ensaios agudos e crônicos podem ser conduzidos: estático, semi estático e de fluxo contínuo de acordo com o método de adição da substância teste, como descritos pela American Public Health Association (1998) e Adams e Rowland (2003). O sistema estático consiste em unidades experimentais, onde a água contendo o agente tóxico permanece, sem trocas, por todo o período experimental. Este tipo de sistema pode ser usado para agentes tóxicos estáveis, que não se volatilizam ao longo do tempo ou que não sofrem outros tipos de alterações. Devem ser levados em consideração também o potencial de adsorção da substância testada, a absorção da substância pelo organismo teste, a diminuição do oxigênio dissolvido, assim como o aumento da demanda bioquímica/química do oxigênio (DBO/DQO). Esse tipo de sistema é sugerido para ensaios rápidos, como é o caso dos ensaios agudos, de 48h a 96h. Ensaios com *Daphnia* (24 a 48h) são comumente usados com este sistema (Walker *et al.*, 2001). Já no sistema semi estático ocorre troca parcial ou total da solução do sistema durante os ensaios devido à instabilidade do agente tóxico, como a volatilização, provocando uma diminuição da concentração inicial do contaminante, sendo necessária renovação da solução a cada 24 ou 48h, e depende da amostra testada e do organismo teste. Trocas da solução teste a cada 24h são realizadas no ensaio com *Danio rerio*, enquanto que trocas a cada 48h são sugeridas

para *Pimephales promelis*. Esse tipo de sistema é sugerido para os ensaios crônicos, como *Ceriodaphnia dubia* (7 dias) e *Daphnia magna* (21 dias) (ADAMS, 1995). Por fim, o sistema de fluxo contínuo, neste caso há uma renovação contínua da solução, mantendo sempre a mesma proporção inicial do agente tóxico do ensaio. Este sistema é recomendado para ensaios crônicos onde a substância testada possui volatilidade ou biodegradabilidade altas. A renovação constante da solução teste impede também que haja acúmulo de fezes, algas, muco, sobra de comida etc (WALKER *et al.*, 2001). Este sistema foi também implementado para *Ceriodaphnia dubia* por Lauth *et al.* (1996) e pode ser utilizado para outros organismos testes, como larvas de peixes.

7.4 Interferências na Toxicidade dos Agentes Tóxicos

De acordo com Aragão e Araújo (2006), a toxidade dos agentes tóxicos é influenciada pelas características químicas da água do ambiente. Ao planejar um ensaio toxicológico é necessário conhecer a substância que será testada, em relação, por exemplo, a volatilidade, a degradação e a adsorção. Substâncias voláteis terão sua concentração inicial da solução teste decrescida ao longo do tempo, por isso, nesse caso, é necessário o uso de sistemas semi estáticos ou de fluxo contínuo para que a concentração inicial do agente tóxico permaneça a mesma ao longo de todo o ensaio. O mesmo vale para as duas outras características, degradação e adsorção da substância teste. No caso da adsorção, a toxicidade da substância pode diminuir visto que ela poderá se associar à matéria orgânica disponível nos frascos teste, como as fezes do organismo produzidas ao longo do experimento ou ainda a sua capacidade de se associar a parede do próprio frasco, consequentemente essas duas situações levam a uma redução na disponibilidade do agente tóxico.

Os fatores abióticos da água onde será adicionado o agente tóxico também influenciam sua toxidade visto que alteram a sua biodisponibilidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Dentre esses fatores, podemos citar a dureza, o pH, a salinidade e a quantidade de carbono orgânico dissolvido. Um exemplo disso são as águas com dureza elevada que proporcionam uma diminuição na biodisponibilidade do contaminante, pois o excesso de íons cálcio e magnésio influenciam na especiação de metais. Os fatores bióticos também podem afetar os resultados dos ensaios de toxicidade, dentre eles, o estágio de vida, o tamanho, a idade e o estado nutricional dos organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Incluindo a esses fatores todos, o período de duração dos experimentos e a concentração das substâncias também devem ser considerados no planejamento dos ensaios, pois podem ser obtidos resultados falsos negativos. Por isso, é necessário realizar ensaios prévios para se definir essas duas condições, caso não haja valores já determinados de CL_{50}.

7.5 Padronização dos Ensaios Ecotoxicológicos Crônicos

Em virtude desses vários fatores que influenciam na toxicidade dos agentes tóxicos, muitos ensaios foram padronizados em nível internacional e nacional por agências e organizações particulares ou governamentais. Deste modo, resultados errôneos são minimizados e, deste modo, limites permissíveis de várias substâncias químicas podem ser estabelecidos com confiabilidade e servir de guia para as entidades reguladoras na tomada de decisões. As principais associações padronizadoras são: Environmental Protection Agency dos Estados Unidos (Usepa), Environment Canada, American Public Health Association (APHA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Association Française de Normalisation (Afnor), Association of Analytical Communities (Aoac) e International Organization for Standardization (ISO). No Brasil, os ensaios ecotoxicológicos são padronizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb). Na Tabela 7.1, estão descritos alguns dos ensaios ecotoxicológicos crônicos padronizados pela ABNT.

Os resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados e confiáveis poderão servir de base não só para definição do lançamento ou não de efluentes e também para complementar os estudos de monitoramento ambiental garantindo a proteção dos ecossistemas (RONCO; BÁEZ; GRANADOS, 2004; COSTA *et al.*, 2008).

7.6 Procedimentos para a Realização de Ensaios Crônicos

Ao planejar ensaios crônicos para serem aplicados em um MEA alguns procedimentos devem ser seguidos, por exemplo, a escolha dos locais de amostragem; como serão realizadas as coletas das amostras; em qual frequência serão realizadas as coletas e de que forma serão feitos os registros; como estes dados serão tabulados, validados e interpretados em

relação aos objetivos dos ensaios de toxicidade. Essas informações normalmente são preconizadas em guias e normas de monitoramentos, entre eles, o Environment Canada (1992a, 1992b, 1998, 2007a, 2007b, 2007c), os métodos da U.S. EPA (1994a, 1994b) e as normas da ABNT (2004a, 2004b, 2005a; 2005b).

7.6.1 Locais de Amostragem

Primeiramente faz-se um estudo da área a ser amostrada a fim de identificar as potenciais fontes de contaminação. Para determinar a localização dos pontos amostrais no corpo receptor onde os efluentes são lançados e que potencialmente têm impacto ambiental mais adverso, devem ser tomados em consideração: a localização dos lançamentos das substâncias deletérias; a maneira pela qual ocorre as misturas de efluentes na área de exposição; e a caracterização histórica do local ou dados pretéritos de toxicidade subletais. No caso de haver dificuldade em identificar qual fonte de descarga tem o maior potencial para afetar o meio ambiente, é necessário que se faça uma série de ensaios de toxicidade subletais de concentração única de cada local de descarga final para determinar os locais com respostas subletais maiores (ENVIRONMENT CANADA, 2012).

Segundo Nascimento (2002), no caso de avaliações ambientais, coleta-se amostras de água e de sedimento e, no caso de amostras de efluentes, indica-se que a coleta seja efetuada antes e/ou depois do mesmo ser submetido ao tratamento ou ainda após sua mistura com outro tipo de efluente.

7.6.2 Coleta das Amostras

De acordo com os guias e normas internacionais e nacionais, recomenda-se que sejam realizadas coletas de amostras compostas por períodos variáveis (inferiores a 24h) a fim de obter a toxidade média desse efluente. Este tipo de amostragem é recomendado para efluentes brutos ou tratados com curto tempo de retenção. No entanto, quando o efluente é lançado em regime de intermitência (batelada), o seu tempo de retenção é superior a 15 dias ou, quando já se conhece a ecotoxicidade temporal do efluente, recomenda-se que seja efetuada a coleta de amostras simples (instantâneas) que poderão identificar os picos de efeitos tóxicos máximos e mínimos, dependendo da frequência da amostragem (U.S. EPA, 2002a; BERTOLETTI, 2013).

Frequência das Coletas e Registros

Em programas de MEA recomenda-se que a coleta de águas continentais para realização dos ensaios de toxicidade seja realizada duas vezes ao ano, durante os três primeiros anos (ENVIRONMENT CANADA, 2012). No Brasil, esta frequência poderá ser maior nos casos em que não há conhecimento prévio do potencial tóxico da área estudada e nos casos em que já foram detectados efeitos tóxicos anteriormente.

Segundo Nascimento (2002), para se determinar a frequência de coletas em amostras de águas marinha e estuarina também devem ser considerados fatores de variações da maré, correntes, estações do ano, diluição das descargas e profundidade. No caso de amostras estuarinas, é necessário que se evite variações ocasionadas pela ação das marés, por isso, sugere-se que as coletas sejam realizadas durante as marés de quadradura. No entanto, se o objetivo do estudo é avaliar o fluxo de poluentes e os níveis de diluição nessa região, recomenda-se que se faça as coletas nos períodos de baixa-mar e preamar, preferencialmente nas marés de sizígia.

No momento das coletas, é necessário que se evite a aeração e a agitação do efluente a fim de minimizar a perda dos químicos que são voláteis. Os frascos usados na coleta dessas amostras, a forma de coleta e os procedimentos de transporte e armazenagem das amostras coletadas devem seguir também as normas preconizadas pela ABNT, CETESB, U.S. EPA e Environment Canada.

Deve-se também fazer a correta identificação das amostras indicando a data, tempo, localização, duração e procedimentos usados na amostra do efluente e na coleta de água de diluição (U.S. EPA, 2002a).

7.6.3 Ensaio Crônico

De acordo com Zagatto e Bertoletti (2006), os ensaios de toxicidade crônica mais difundidos no mundo são os ensaios com *Daphnia*, com duração de 21 dias, e com *Ceriodaphnia*, de 7 dias de duração. Este último tem sido mais utilizado para a avaliação de toxicidade crônica de amostras ambientais (águas e efluentes líquidos), enquanto o ensaio com *Daphnia* é mais utilizado para a avaliação da toxicidade de novas formulações químicas. A Tabela 7.10 apresenta a lista de ensaios tóxicos crônicos normatizados no Brasil.

Tabela 7.1 Ensaios ecotoxicológicos crônicos normatizados pela ABNT.

Organismo teste	Sistema	Tipo de amostra analisada	Número da Norma	Referência
Algas: *Chlorella vulgaris, Desmodesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata*	Estático	Amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água	ABNT-NBR 12648 CETESB, L5.02042	ABNT, 2011
Microcrustáceos: *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii.*	Semi estático	Amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água	ABNT-NBR 13373	ABNT, 2014
Peixes: Larvas de *Danio rerio* ou *Pimephales promelas*	Semi estático	Amostras de efluentes, águas continentais e substâncias químicas	ABNT-NBR 15499	ABNT, 2015
Equinoderma: Fase embriolarval de *Lytechinus variegatus* ou *Echinometra lucunter*	Estático	Amostras de água marinha, estuarina, intersticial de sedimento, interface sedimento e água, efluentes líquidos, elutriato, substâncias químicas solúveis ou dispersas em água	ABNT-NBR 15350	ABNT, 2012

7.6.4 Validação, Tabulação e Interpretação dos Dados Obtidos nos Ensaios de Toxicidade

Para que os dados dos ensaios ecotoxicológicos sejam validados, vários critérios devem ser seguidos, entre eles, a qualidade dos laboratórios. Uma das formas de avaliar a qualidade dos laboratórios é por meio da acreditação no âmbito da Organização Internacional de Normalização padrão ISO/IEC 17025:2005, intitulada "Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração".

O laboratório deve ter um programa de garantia da qualidade das análises (GQ) a fim de que os resultados obtidos possam ter precisão, exatidão, representatividade, comparabilidade e integrabilidade (BADARÓ-PEDROSO; REYNIER; MELO, 1997). Além do que está descrito nos métodos de ensaio de toxicidade subletais individuais, outros requisitos e recomendações devem ser seguidas de acordo com o guia canadense (ENVIRONMENT CANADA, 2012), por exemplo, o ensaio da amostra referência deve ser conduzido da mesma maneira que o ensaio da amostra coletada na região próxima ao efluente.

Segundo o guia canadense, os dados obtidos podem ser rejeitados se um ou mais elementos essenciais do método de ensaio não forem seguidos (a falta de critérios de saúde dos organismos, manipulações inadequadas da amostra, entre outros).

Ao se concluir, tanto os ensaios crônicos quanto os agudos, devem ser registrados os efeitos tóxicos (mortalidade e outros) ocorridos em cada uma das diluições das amostras testadas, para que, de posse desses dados, possam ser calculados os valores de CE_{50}, CL_{50}, CE_{25}, CL_{25}, Ceno e CEO (BERTOLETTI, 2013), sendo estes dois últimos cálculos os de maior importância nos ensaios crônicos. Isto por que um dos objetivos desse ensaio é identificar a concentração da amostra que não provoca danos de importância ecológica, como na sobrevivência, reprodução e crescimento (CAPIZZI *et al.*, 1985; BURATINI; BERTOLETTI, 2006).

Os dados obtidos nos ensaios crônicos podem ser interpretados a partir de hipóteses ou de métodos de estimativa pontual, segundo a U.S. EPA (2002b). O primeiro tipo de análise (hipótese) é particularmente recomendado para comparar uma única concentração da amostra com um controle (CHAPMAN, 1996), é a metodologia mais usada devido a sua simplicidade dos cálculos e por poder ser usada para qualquer variável biológica (BAILER; ORIS, 1997). Utiliza-se de análises estatísticas simples do tipo teste "t" (um tratamento comparado com o controle) e ANOVA (compara mais de um tratamento com o grupo controle). Enquanto que os métodos de estimativa pontual são indicados para se estimar a concentração que causa uma porcentagem específica de diminuição da resposta em relação àquela registrada no grupo controle (relação concentração/resposta) (BURATINI; BERTOLETTI, 2006). Neste caso, são usados modelos paramétricos (probitos) e não paramétricos (interpolação linear) (U.S. EPA, 2002b).

7.7 Avaliação de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia* segundo ABNT NBR 13373:2005

A realização desse ensaio é indicada para avaliar a toxicidade crônica de amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água para *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*. O princípio deste ensaio consiste em expor organismos jovens do gênero *Ceriodaphnia* a várias diluições da amostra, por um período de aproximadamente 7 dias (ABNT, 2005). No caso do MEA, é muito indicado para avaliar o potencial tóxico de efluentes.

Sugere-se, inicialmente, que se faça um ensaio preliminar a fim de estabelecer um intervalo de soluções teste a ser usado no ensaio definitivo. Para isso, devem ser preparadas diluições da amostra e, para cada uma, devem ser utilizados, no mínimo, 5 organismos testes. Ao final do ensaio, terá sido determinada a menor solução teste que causa imobilidade a 100% dos organismos e a maior solução teste na qual não se observa imobilidade. Neste caso, o tempo de exposição dos organismos pode ser de 24h. O ensaio deve ser conduzido nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo do ensaio definitivo.

O ensaio definitivo é iniciado com o preparo das soluções testes. Com base em informações conhecidas da amostra ou no intervalo de concentrações determinadas no ensaio preliminar, é preparada uma série de soluções teste com razão de diluição de 1,2 a 2. Caso o objetivo do ensaio seja determinar os valores de Ceno e CEO, é necessário que se teste, além do controle, pelo menos 5 soluções teste. No caso de análises qualitativos, não são necessárias essas diluições.

Para cada concentração devem ser preparadas 10 replicatas contendo cerca de 15 ml da solução teste em cada recipiente teste (recipiente de vidro ou de outro material que não interfira no resultado do ensaio) com alimento. A transferência dos organismos teste para os frascos deve ser preferencialmente de forma aleatória, colocando um indivíduo em cada um dos frascos testes sempre com auxílio de uma pipeta. O organismo deve ser liberado da pipeta na região superficial da solução a fim de evitar a entrada de ar sob sua carapaça e sua consequente flutuação.

O ensaio deve ser conduzido numa faixa de temperatura entre 23 a 27°C, por cerca de 7 dias e com fotoperíodo de 16h de luz difusa. Os frascos testes devem ser mantidos cobertos. O oxigênio dissolvido e o pH devem ser determinados pelo menos na maior e na menor concentração incluindo o controle. Inclusive as medidas devem ser realizadas nas soluções recém preparadas e naquelas que serão descartadas.

A alimentação deve ser diária de forma que os organismos testes não fiquem mais de 2 dias sem alimento. Devem ser fornecidos cerca de 2,0 x 10^5 células/ml de *Pseudokirchneriella subcaptata*, outra alternativa é fornecer um complemento alimentar à base de ração fermentada ou outros meios nutritivos.

O ensaio é realizado em sistema semi estático onde as soluções devem ser renovadas diariamente ou, no mínimo, 2 vezes durante o ensaio. A cada renovação das soluções teste, o organismo adulto deve ser transferido para aproximadamente 15 ml da solução nova já com alimento. Em cada uma das renovações, deve ser registrado o número de organismos adultos sobreviventes e o número de jovens vivos em cada frasco teste. Se forem observados organismos jovens em um recipiente teste contendo um adulto morto, deve-se admitir, para efeito de cálculo estatístico, que a morte ocorreu imediatamente antes da contagem e computar os jovens vivos.

O oxigênio dissolvido e o pH devem ser determinados pelo menos na maior e na menor concentração incluindo o controle. Inclusive as medidas devem ser realizadas nas soluções recém preparadas e naquelas que serão descartadas.

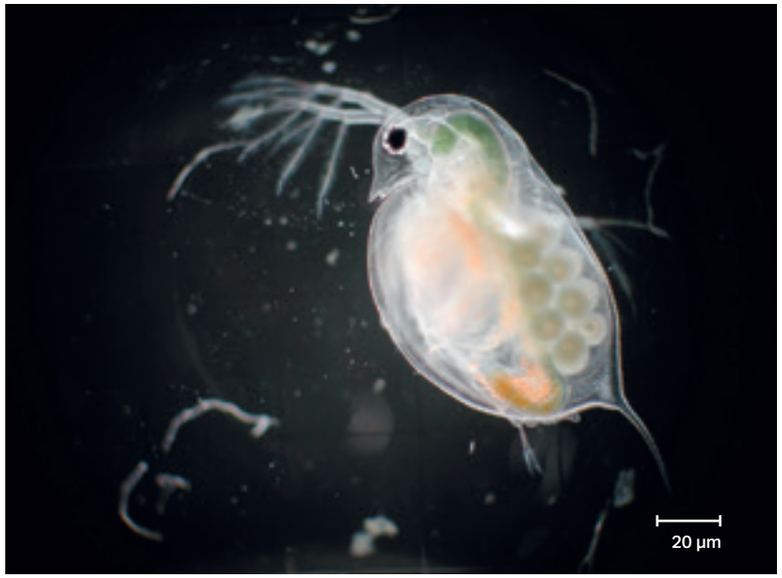
O ensaio deve terminar quando 60% ou mais das fêmeas adultas sobreviventes no controle tiverem produzido no mínimo 15 organismos jovens não ultrapassando o oitavo dia.

Recomenda-se o uso de um microscópio esteroscópio na contagem. O organismo jovem nascido durante o ensaio e o adulto no término do ensaio não devem ser reutilizados e nem descartados diretamente no ambiente.

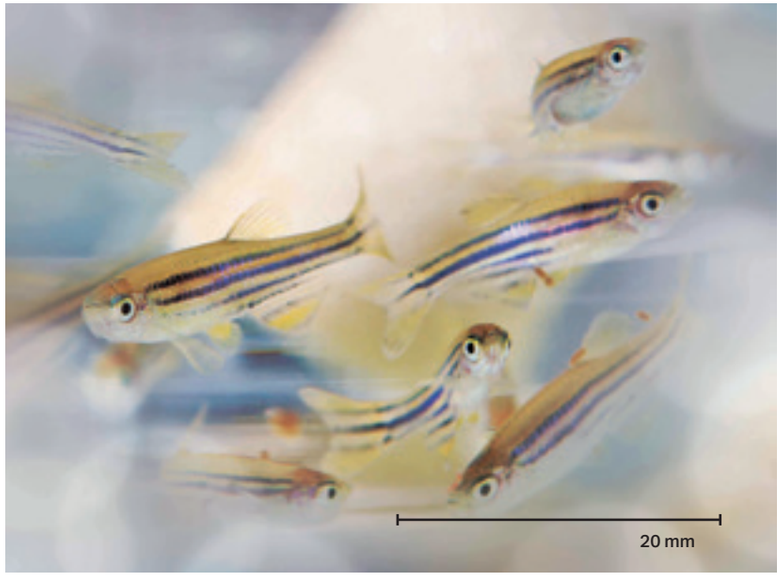
Algumas características da amostra, como oxigênio dissolvido, pH e material particulado, podem interferir no resultado do ensaio. Caso seja necessário evidenciar a influência destas características, um ensaio em paralelo deve ser realizado com modificações ou ajustes efetuados na amostra.

Com base nos resultados obtidos na sobrevivência dos organismos teste será possível calcular os valores de Ceno, CEO, VC CIp, tóxico e não tóxico e efeito agudo.

Todas as informações contidas neste item foram compiladas da norma da ABNT NBR 13373:2005. Para outras informações, como preparação e preservação das amostras, reagentes, material, carta controle de sensibilidade, preparo de soluções teste (substâncias químicas ou efluentes), análise dos dados e cultivo de *Ceriodapnhia spp,* deve ser consultada a norma ABNT NBR 13373:2005.



A



B

C

D

Figura 7.1 Exemplos de organismos teste utilizados em ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos no Brasil. Ⓐ *Daphnia similis*, Ⓑ *Danio rerio*, Ⓒ *Mysidopsis juniae*, Ⓓ *Echinometra lucunter*.

8 Monitoramento do sedimento

Tatiana Heid Furley
Clayton Perônico
Larry Mark Hewitt

8.1 Considerações Gerais p207

8.2 Coleta das Amostras de Sedimento p207
- 8.2.1 Medições e Observações em Campo p207
- 8.2.2 Critério para Seleção do Coletor de Amostras de Sedimento p208
- 8.2.3 Profundidade da Penetração do Amostrador p209
- 8.2.4 Volume de Sedimento p209
- 8.2.5 Operação do Amostrador p212
- 8.2.6 Critérios de Aceitabilidade das Amostras p212
- 8.2.7 Réplicas p212
- 8.2.8 Análises em Campo p213

8.3 Manipulação do Sedimento e Análise p213
- 8.3.1 Manipulação do Sedimento p213
- 8.3.2 Amostras Compostas de Sedimento p213
- 8.3.3 Transporte e Estocagem das Amostras de Sedimento p213
- 8.3.4 Acondicionamento da Amostra p214
- 8.3.5 Preparação das Amostras p214
- 8.3.6 Secagem da Amostra p214
- 8.3.7 Prevenção da Contaminação da Amostra de Sedimento p215

8.4 Determinação da Granulometria p215

8.5 Determinação do Conteúdo de Carbono Orgânico p215

8.6 Determinação da Concentração de Metais no Sedimento p216

8.7 Ensaio de toxicidade com Sedimento p217

8.1 Considerações Gerais

Como parte do levantamento da estrutura da comunidade de invertebrados bentônicos, amostras de sedimento serão coletadas para análise da contaminação química, do conteúdo de carbono orgânico total (COT) e da granulometria. As amostras de sedimento deverão ser coletadas nos mesmos pontos que as amostras de bentos. Os resultados das análises químicas do sedimento deverão incluir o cálculo da média, a mediana, o desvio padrão, o erro padrão, o valor máximo e mínimo para cada ponto de amostragem. Os resultados das análises de granulometria e COT são usadas para avaliar se a diferença encontrada nos resultados da comunidade de invertebrados bentônicos se deve à diferença do *habitat* na área referência e na área de exposição ao efluente de forma auxiliar na interpretação. O objetivo geral do monitoramento de sedimento é responder às perguntas: existe alguma diferença entre os *habitats* que está contribuindo para os efeitos observados na estrutura da comunidade de invertebrados bentônicas? Esta diferença pode ser atribuída aos fatores naturais ou antropogênicos?

8.2 Coleta das Amostras de Sedimento

Esta sessão fornece informações sobre coleta, manipulação, estocagem e transporte das amostras de sedimento e também sobre as medições e observações a serem realizadas em campo.

8.2.1 Medições e Observações em Campo

As medições e observações em campo são muito importantes para qualquer estudo de coleta de sedimento. Recomenda-se que no momento da amostragem sejam registradas as seguintes informações em cada ponto amostral:

- Número da amostra, número da réplica, nome do ponto amostral, identificação do ponto amostral;
- Data e hora da coleta da amostra;
- Condições do clima, velocidade do vento, direção do vento, correntes, maré, temperatura do ar e da água;
- Localização geográfica do ponto amostral e de cada réplica;
- Tipo de equipamento utilizado para coleta do sedimento;
- Profundidade d'água em cada ponto amostral e profundidade da camada de sedimento coletada;
- Nome da equipe coletora;
- Registar eventos não usuais ou não previstos que ocorram durante a coleta de amostras (por exemplo, contaminação da amostra, falha no equipamento e integridade do segmento);
- Descrição do sedimento, incluindo textura e consistência, cor, odor, presença da biota, estimativa da quantidade de sedimentos coletada ou comprimento e aparência dos testemunhos. Fotografias da amostra deverão ser tiradas;
- Desvios nos procedimentos de operação padrão.

8.2.2 Critério para Seleção do Coletor de Amostras de Sedimento

Existem vários métodos na literatura que descrevem tipos de amostradores de sedimento para diferentes tipos de ambientes, incluindo sedimentos continentais, marinhos ou estuarinos. Os seguintes fatores deverão ser considerados na seleção do amostrador de sedimento ideal:

- Permitir a passagem da água durante a descida do amostrador para evitar pressão de ondas ao chegar no sedimento;
- Ter uma superfície externa que facilite o corte do sedimento e minimize os distúrbios quando amostrador entrar em contato com o mesmo;
- O amostrador deve fechar muito bem e evitar a perda de amostra na subida do mesmo;
- Permitir a coleta de sedimento suficiente para obter subamostras;
- Ter capacidade de ajustar o peso para a penetração em diferentes tipos de substrato;
- Ser capaz de coletar volume de sedimento suficiente para atender às necessidades analíticas do laboratório;
- Permitir a coleta de sedimento em várias profundidades;
- Permitir a coleta de profundidade específica de sedimento;
- Não contaminar ou influenciar a natureza do sedimento;
- Requerer equipamento suporte de tamanho pequeno;
- Ser de fácil operação e não requerer a equipe altamente treinada;
- Ser facilmente transportado para o local da coleta.

Existem dois tipos principais de amostrador de sedimento: garras (Figura 8.1) e testemunhos. Recomenda-se usar o amostrador tipo garra para coletar sedimento superficial e avaliar a distribuição horizontal das características do sedimento usar amostrador do tipo testemunho para coletar sedimento numa coluna vertical e examinar a distribuição histórica das características físicas e químicas do sedimento (são preferíveis nos casos onde é essencial se respeitar a integridade do perfil da amostra); recomenda-se o uso das garras para os estudos biológicos e o uso de testemunhos para amostragem de investigação da causa dos efeitos ambientais e da magnitude extensão geográfica dos efeitos.

8.2.3 Profundidade da Penetração do Amostrador

A profundidade de penetração do equipamento de coleta é uma decisão que depende do tipo de amostrador, da natureza do sedimento e do volume de sedimento necessário. Geralmente a maioria dos contaminantes recentemente introduzidas estão na camada superior onde também estão a maioria dos organismos bentônicos. Assim, baseado no Environment Canada (2012), recomenda-se a coleta de sedimento numa profundidade 10 a 15 cm e uma penetração mínima de 6 a 8 cm.

8.2.4 Volume de Sedimento

O volume da amostra a ser coletada dependerá das análises químicas e biológicas que serão realizadas Antes de coletar a amostra de sedimento (Figura 8.2), um planejamento das análises a serem realizadas deverá ser feito juntamente com o cálculo do volume necessário. Esse volume também deverá permitir a replicação das análises quando necessárias.

Figura 8.1 Amostrador tipo garra utilizado para coleta de bentos e de sedimento.

Figura 8.2 Amostra de sedimento coletada para avaliação da comunidade de invertebrados bentônicos.

8.2.5 Operação do Amostrador

Durante a coleta de sedimento, a velocidade de descida do amostrador deverá ser controlada para minimizar o distúrbio da amostra. O amostrador deverá entrar em contato com substrato se posicionando sobre ele usando somente o seu peso e acionando o mecanismo de pistão para forçar a penetração para dentro do sedimento. Depois de coletada a amostra, o equipamento deverá ser erguido vagarosamente a partir do fundo numa velocidade de 30 cm/s. Quando o amostrador é trazido para superfície, este deverá ser inspecionado quanto ao seu fechamento correto. Após o acondicionamento da amostra, o equipamento deverá ser lavado cuidadosamente com água coletada no ponto de amostragem. E depois ambientado utilizando água do próximo local de coleta.

8.2.6 Critérios de Aceitabilidade das Amostras

Todas as amostras deverão ser inspecionadas visualmente para garantir que a profundidade desejada de penetração do equipamento foi alcançada, que não exista evidência de fechamento incompleto do amostrador ou que o mesmo não tenha sido inserido num ângulo inadequado; caso a amostra coletada não atenda os critérios acima mencionados, esta deverá ser rejeitada e uma nova amostra deverá ser coletada no ponto. As amostras rejeitadas deverão ser lançadas no ambiente de forma a não afetar as amostragens subsequentes. Uma nova amostra deverá ser coletada bem próximo ao local de origem, mas evitando coletar no mesmo local devido a ressuspensão causada pela primeira amostragem.

8.2.7 Réplicas

Amostras únicas de sedimento a partir de um ponto irão fornecer poucas informações sobre a variabilidade. A coleta de subamostras a partir de uma amostra poderá ser usada para medir a variação dentro de uma amostra, mas não necessariamente dentro do ponto amostral. A coleta de réplicas fornece informação valiosa da heterogeneidade do sedimento e permite comparação estatística quantitativa entre as réplicas do mesmo ponto e entre pontos diferentes.

O número de réplicas necessárias por ponto amostral varia em função da necessidade da sensibilidade ou da potência estatística. A agência ambiental canadense recomenda número mínimo de 5 réplicas por ponto amostral, a não ser que estudos pretéritos justifiquem menos, e poderá ser maior que 5 réplicas nas áreas localizadas próximo à fonte de contaminação.

8.2.8 Análises em Campo

Em campo é recomendado medir algumas informações como temperatura, pH (para ambientes marinhos), potencial redox dos sedimentos para determinar se são sépticos, oxigênio dissolvido (para ambientes continentais). Essas medidas podem ser usadas para auxiliar a interpretação dos resultados analíticos.

8.3 Manipulação do Sedimento e Análise

8.3.1 Manipulação do Sedimento

É prudente evitar o contato da pele com os sedimentos usando roupas e equipamentos, como luvas, botas, jalecos, óculos de segurança, tanto na coleta quanto na manipulação e na preparação.

A manipulação dos sedimentos deverá ser realizada em áreas bem ventiladas para minimizar inalação de gases do sedimento.

A manipulação das amostras de sedimento deverá ser realizada em bandejas de teflon ou polietileno de alta densidade ou material inerte.

8.3.2 Amostras Compostas de Sedimento

Se o objetivo do estudo é preparar amostras compostas a partir de amostragens diferentes, estas deverão ser colocadas dentro de um contêiner limpo, preenchido por completo e de preferência sem ar (dependendo do objetivo). Poderão ser preparadas tanto em campo como em laboratório.

8.3.3 Transporte e Estocagem das Amostras de Sedimento

As amostras deverão ser transportadas em ambiente refrigerado a 4˚C ou mantida em ambiente com gelo ou com pacotes de gel congelado em temperatura de abaixo 7˚C até o laboratório.

As amostras não deverão congelar durante o transporte. Idealmente um termômetro de máxima e mínima deverá ser colocado dentro do contêiner. Dois graus de variação na temperatura deverão ser reportados.

As amostras dentro do contêiner não deverão entrar em contato com a luz.

Cada contêiner deverá ser etiquetado, estabilizado em posição em pé para o seu transporte. A etiqueta deverá conter, no mínimo, a localização, o nome do ponto amostral, a identificação, o tipo de amostra, o método de coleta, o nome do coletor e o dia e hora da coleta.

8.3.4 Acondicionamento da Amostra

A amostra de sedimento deverá ser transferida diretamente para o frasco limpo; frascos de boca larga e tampas inertes são recomendados. As amostras deverão ser estocadas a 4°C. Se as amostras tiverem que ser congeladas em frascos de vidro, estes não deverão ser preenchidos por completo, e um espaço de 2 a 5cm deverá ser deixado para permitir a expansão da amostra no congelamento. As amostras deverão ser acondicionadas em locais sem incidência de luz e poderão ser embrulhadas com material opaco, por exemplo, uma folha de papel alumínio limpa para eliminar a incidência de luz e reduzir perda de amostra no caso de quebras acidentais.

8.3.5 Preparação das Amostras

Para o monitoramento biológico e estudo de magnitude e extensão geográfica, as amostras de sedimento não necessitam ser realizadas em condições anóxicas. Entretanto, para investigação da causa dos efeitos tóxicos, a preparação das amostras de sedimento deverá ser realizada em caixas contendo gás inerte para manter as condições anóxicas.

As amostras deverão ser homogeneizadas quanto a cor, textura e mistura, manualmente ou com ajuda mecânica.

8.3.6 Secagem da Amostra

Para a análise química, a secagem de 5g de sedimento em baixas temperaturas entre 40 e 60°C ou a liofilização até que o peso da amostra permaneça constante, em geral, são o suficiente para grande parte das análises. Procedimentos específicos poderão ser necessários dependendo do tipo de análise.

8.3.7 Prevenção da Contaminação da Amostra de Sedimento

Quando o sedimento é coletado para análise química e o equipamento de coleta contém contaminantes que possam alterar os resultados, uma subamostra que não entrou em contato com as paredes do equipamento deverá ser selecionada ainda em campo. Toda a vidraria e recipientes deverão ser lavados, mesmo que novos, para remoção de resíduos.

8.4 Determinação da Granulometria

A determinação da granulometria é muito importante para interpretar os resultados do estudo da comunidade bentônica e também fornece informações sobre o material de origem do sedimento e as condições hidrodinâmicas de transporte e deposição do mesmo. Existem diferentes tipos de classificação do tamanho das partículas de sedimento e a tabela de Wentworth (1922) é recomendada (Tabela 8.1). Procedimentos para análise da granulometria do sedimento podem ser encontrados no ASTM (2003).

Tabela 8.1 Classificação do tamanho das partículas de sedimento.

Classificação	Tamanho da partícula (mm)
Cascalho	16.0 - 2.0
Areia grossa	2.0 - 0.2
Areia fina	0.2 - 0.062
Silte	0.062 - 0.0039
Argila	<0.0039

8.5 Determinação do Conteúdo de Carbono Orgânico

O conteúdo de carbono orgânico total deverá ser determinado, no mínimo, em uma amostra de cada ponto de coleta do estudo de bentos. O carbono orgânico no sedimento e na coluna da água causa o decréscimo de oxigênio dissolvido criando ambientes mais anóxicos. Em certos níveis de pH, substâncias húmicas formam complexos com metais, aumentando a solubilidade do metal na coluna d'água. Dois métodos comumente usados para analisar carbono orgânico total no sedimento: o método analisador elementar, baseado na condutividade térmica, e o método de forno de oxidação, baseado no uso de aspecto fotometria de

infravermelho, são recomendados. Os procedimentos para esses métodos de análise de carbono orgânico total estão descritos no U.S. EPA (1986) e no APHA (1995).

8.6 Determinação da Concentração de Metais no Sedimento

A determinação da concentração de metais no sedimento não é obrigatória no programa de monitoramento ambiental canadense. Entretanto, em locais onde ocorre a chegada de efluentes ricos em metais, esses compostos deverão ser analisados.

Os sedimentos são originários tanto a partir de partículas suspensas do solo, que chegaram ao ecossistema aquático e se depositaram, quanto a partir de precipitados de processos químicos e biológicos no sistema aquático. Partículas não contaminadas em suspensão na água também podem acumular contaminantes solúveis presentes na água. Com o processo de precipitação, o sedimento é capaz de guardar os contaminantes, servindo como um reservatório de contaminantes. Sedimentos contaminados podem se tornar biodisponíveis e entrar na cadeia alimentar causando efeitos. Os sedimentos promovem uma melhor integração da média das condições ambientais de amostras de água ao longo do tempo, sendo mais eficaz que uma amostragem única de água.

A seleção dos tipos de metais a serem analisados no sedimento será determinada de acordo com o local, com dados históricos, com a caracterização do efluente e com os dados de qualidade da água. Como grande parte dos contaminantes se agrega a partículas finas do sedimento, é recomendado que as amostras de sedimentos sejam peneiradas em malha de 60 e 3 µm, consecutivamente, e seja analisada apenas a fração fina inferior a 3 µm. Os dados metais do sedimento deverão ser normalizados para partículas finas usando a seguinte equação (ESP, 1996):

$$Metal_{NF} = \frac{Metal}{Partículas\ finas}$$

Onde:

$Metal_{NF}$ = Concentração normalizada de metais para partículas finas

Metal = Relatos da concentração de metais no sedimento (mg/Kg)

Partículas finas = Proporção de partículas finas em sedimento

8.7 Ensaio de toxicidade com Sedimento

Os ensaios de toxicidade com sedimento total poderão ser realizados para avaliar o potencial de efeito que os contaminantes presentes no ambiente podem causar às comunidades bentônicas, verificar se as alterações observadas nas comunidades bentônicas se devem a fatores químicos e não a fatores físicos ou biológicos e, possivelmente, auxiliar na interpretação de falsos resultados positivos.

peixeguia
monitoramento ambiental
Sistema FINDES

9 Avaliação dos dados e interpretação

Francisco Candido Cardoso Barreto
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick

9.1 Considerações Gerais p223

9.2 O Papel da Análise de Poder do Teste, α, β e Tamanho do Efeito Critico na Determinação de Efeitos no Monitoramento p226
- 9.2.1 Ajustando α e β p226
- 9.2.2 Cálculo do Poder do Teste a priori p228

9.3 Entendendo as Definições sobre Efeito e o Significado da Interpretação dos Dados Dentro de um Programa de MEA p228

9.4 Avaliação e Intepretação dos Dados no Estudo de Peixes p229

9.5 Preparativos para as Análises p233
- 9.5.1 Estatística Descritiva p233
- 9.5.2 Analise de Variância (ANOVA) e Análise de Covariância (ANCOVA) p234
  - 9.5.2.1 ANOVA p234
  - 9.5.2.2 ANCOVA p234
- 9.5.3 Análise dos Resíduos p235
- 9.5.4 Níveis de Replicação p235

9.6 Levantamento e Interpretação dos Dados para Estudos da Comunidade de Invertebrados Bentônicos p236

9.7 Delineamento do Estudo e Procedimentos Estatísticos p236

9.8 Utilização de Condições de Referência p237

9.9 Valores Limites Complementares (de Suporte) p237

9.10 Considerações Finais e Recomendações para Programas de Monitoramento de Efeitos Ambientais p238

9.1 Considerações Gerais

Neste capítulo serão apresentados alguns dos procedimentos e abordagens para realizar uma análise efetiva de dados e, antes disso, realizar cálculos sobre o número de amostras necessárias para aumentar a probabilidade de que os efeitos – *caso existam* – sejam detectados.

Seguindo as recomendações presentes nos Guias Técnicos Canadenses (ENVIRONMENT CANADA, 2010, 2012), no qual este capítulo foi baseado, é necessário que, após conclusão dos estudos, seja preparado um relatório interpretativo com os resultados do monitoramento.

A equipe responsável pelo relatório também deve, quando possível, conduzir análises espaciais e, se houver dados suficientes, análises de série temporal (KEIZER-VLEK *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2013). Devem ainda especificar qualquer efeito identificado e fazer recomendações para os programas de monitoramento subsequentes (incluindo dificuldades e os fatores de confundimento encontrados).

Tão importante quando detectar o efeito, quando presente, é tentar definir suas causas. Isso é necessário tanto para embasar ações de âmbito legal quanto para a proposição de medidas de redução ou eliminação das substâncias ou de agentes envolvidos no mecanismo de resposta identificados na análise do grupo biológico ou variável abiótica mensurada (HEWITT *et al.*, 2003).

A Figura 9.1 demonstra as informações que devem estar presentes em cada um desses relatórios. Essas informações devem estar definidas desde a conclusão do planejamento do programa de Monitoramento de Efeitos Ambientais (MEA) seguindo o exposto no capítulo sobre Desenho Amostral e completado com conteúdo deste capítulo.

Essa interpretação de dados não deve incluir, neste ponto, a importância ecológica, social ou econômica dos resultados. Esses aspectos serão abordados em outro momento. Neste capítulo, será apresentado o modelo geral de como obter e interpretar dados de um programa de MEA, mais especificamente sobre os seguintes pontos:

- Qual valor limite utilizar para cada grupo e como reportá-lo;
- A abordagem estatística a ser utilizada com cada um dos valores limite para determinar a presença ou ausência de um efeito;
- O papel da análise de poder, α, β e tamanho do efeito critico (TEC) no delineamento do projeto e na determinação do número de amostras.

Um programa de MEA envolve ciclos iterativos de monitoramento, análise e divulgação de resultados. Os relatórios devem incluir a identificação de qualquer efeito nas populações estudadas, assim como em seus tecidos e sobre a comunidade de animais invertebrados bentônicos. Esses resultados são expressos e discutidos para cada ponto de amostragem ao longo do gradiente de exposição delimitado. Além disso, como dito anteriormente, deve ser feita uma análise espacial e temporal desses dados (entre os ciclos de monitoramento) para verificar se efeitos previamente detectados estão se tornando mais ou menos intensos no local.

Para os propósitos do monitoramento, apenas os dados específicos, ou seja, os efeitos indicados, obtidos através da amostragem de peixes, da comunidade de invertebrados bentônicos e dos estudos de uso econômico dos peixes, são utilizados para avaliar a presença de efeitos.

Outros dados obtidos pelo monitoramento são utilizados apenas para auxiliar na discussão e na interpretação dos efeitos sobre os peixes e sobre os bentos (exemplo: caracterização do efluente e monitoramento da qualidade da água). Esses dados também podem auxiliar na caracterização de qualquer mudança na qualidade do efluente ao longo do tempo (por exemplo, nos ensaios de ecotoxicidade).

Deve ser dada uma atenção especial na consistência das respostas dos peixes e da comunidade de organismos bentônicos e entre características relacionadas aos peixes em si. Por exemplo, se há aumento na disponibilidade de alimentos (através de algum aporte de nutrientes no sistema) e aumento da abundância nas populações de organismos bentônicos, é esperado que ocorra aumento do tamanho corporal dos peixes, das gônadas e do fígado. Quaisquer inconsistência entre espécies, sexos ou valores limite devem receber uma atenção especial durante a análise.

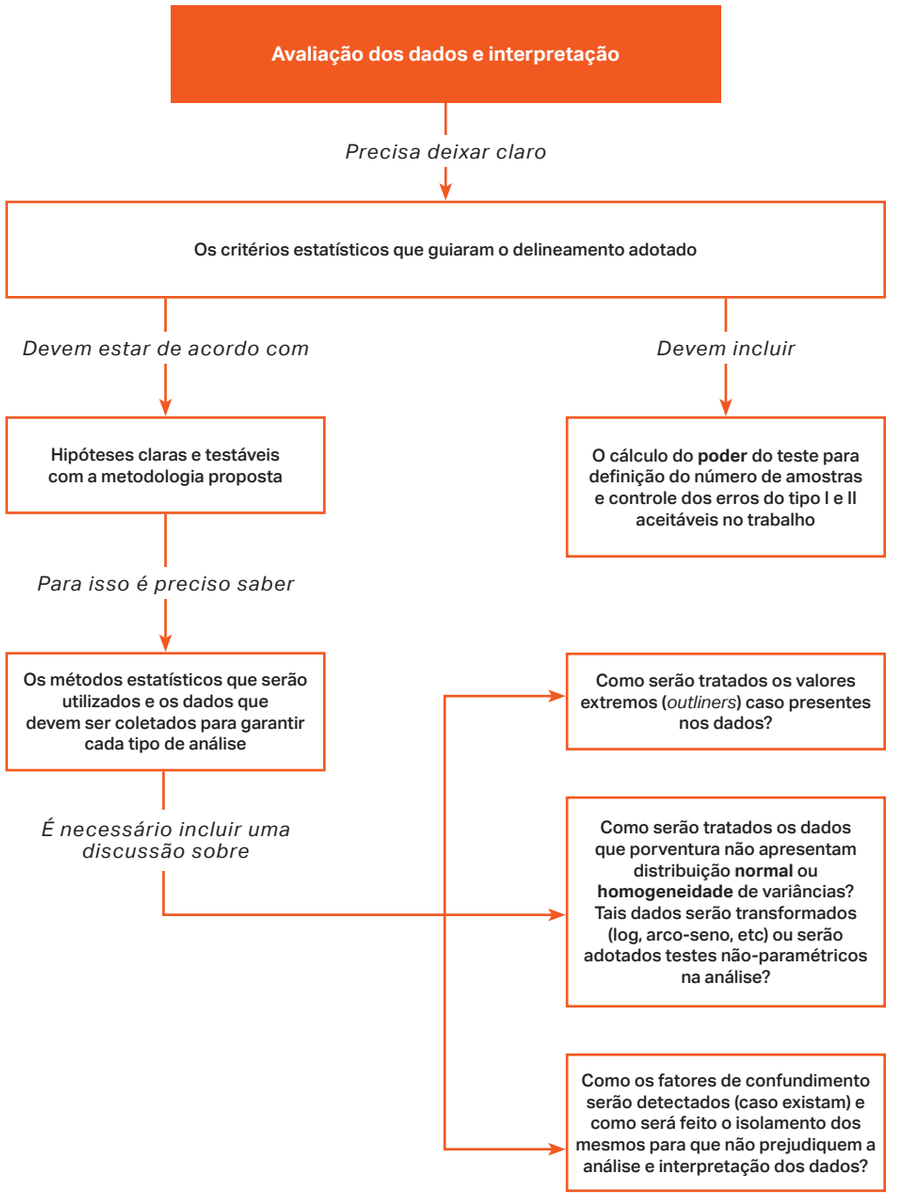


Figura 9.1 Mapa conceitual sobre as informações gerais que devem ser incluídas no relatório interpretativo ao final de cada ciclo de monitoramento.

9.2 O Papel da Análise de Poder do Teste, α, β e Tamanho do Efeito Critico na Determinação de Efeitos no Monitoramento

9.2.1 Ajustando α e β

É importante relembrar que significância estatística e significância biológica não são sinônimos. Se forem coletadas um número muito grande de amostras, qualquer teste de hipóteses terá uma tendência maior de apresentar resultados significativos mesmo que não haja nenhuma importância biológica no que está sendo testado. Esse é o erro do tipo I que ocorre quando rejeitamos a nossa hipótese nula (a uma dada probabilidade α) sendo a hipótese nula verdadeira (por exemplo, afirmar a ocorrência de um efeito em determinado local, mas esse efeito não existe).

Seguindo o mesmo raciocínio, um número muito pequeno de amostras pode levar a uma falha na detecção de um efeito, mesmo este efeito sendo importante do ponto de vista biológico. Isso configura o erro do tipo II onde aceitamos a hipótese nula sendo essa falsa (por exemplo, afirmamos que não existe efeito algum em determinado ponto de amostragem, mas ele existe). A Tabela 9.1 demonstra como se dão essas relações dada a decisão de aceitar ou rejeitar a hipótese nula após a verificação do resultado de um teste qualquer.

A forma de lidar com esses dois aspectos é através do ajuste correto do poder do teste (definido como 1 - β).

Em um programa de MEA bem delineado, o recomendado é manter α e β com valores baixos, alcançando assim um alto poder de detector diferenças caso elas existam. Assim como o α é padronizado a 0.05%, alguns estudos recomendam um poder mínimo de 0.8 sendo esse valor alcançado quando o β é ajustado em 0.2 (ALLDREDGE, 1987; COHEN, 1988; BURD; NEMEC; BRINKHURST, 1990; OSENBERG *et al.*, 1994; KEOUGH; MAPSTONE, 1995).

Tabela 9.1 Os dois tipos de erros estatísticos presentes em testes de hipóteses. Adaptado de Zar (2010).

	H0 é verdadeira	H0 é falsa
H0 é rejeitada	Erro tipo I	Acerto
H0 é aceita	Acerto	Erro tipo II

O poder do teste indica então a probabilidade de um teste rejeitar a hipótese nula em um experimento, sendo ela falsa. Ou seja, ele está relacionado ao erro tipo II (β) e deveria ser de uso habitual em pesquisa.

Infelizmente, houve uma valorização maior das discussões inerentes ao erro do tipo I, e o alfa (α) é o mais frequentemente utilizado (FOX, 2001). Caso o leitor esteja interessado em aprofundar-se nesse tema e, principalmente, entender as consequências desse hábito de aceitar um alfa pré-estabelecido em 0.05 como ideal a todas as situações, recomenda-se a leitura de Mudge *et al.* (2012).

Existem alguns critérios que devem ser levados em conta ao especificarmos o tamanho do poder adequado ao nosso delineamento – adaptado de Kraemer e Thiemann (1987) e de Muller e Benignus (1992):

- Determinação do que é biologicamente significativo: o tamanho do efeito considerado importante, ou seja, a determinação do que é biologicamente significativo, é um dos problemas centrais em diversas áreas da Ecologia e, para isso, não existe uma solução simples (REED; BLAUSTEIN, 1997). Qualquer valor atribuído por um pesquisador para que um determinado fenômeno seja considerado como significativo é, a priori, arbitrário. Há algumas formas de lidar com isso de forma não subjetiva. Uma delas, discutida por Munkittrick *et al.* (2009) é levar em consideração diferenças consideradas incomuns ou anormais dentro de um conjunto de valores de determinada variável ambiental ou característica biológica em um ou mais pontos de referência. Esta abordagem visa quantificar a variação natural do sistema e utilizar esse conhecimento como base para decidir se determinado valor observado faz parte ou não de uma flutuação natural ou se pode ser considerado um efeito;
- A necessidade de um valor alto para o poder, principalmente para salientar diferenças muito pequenas entre médias, que representem diferenças biologicamente relevantes. Quanto menor o efeito que se espera obter, maior o poder necessário e consequentemente maior será o número de amostras necessárias para evidenciá-lo;
- Custos operacionais: envolve a avaliação dos recursos disponíveis para o projeto, pois um alto poder do teste requer um número elevado de amostras. Além de monetários, os custos também incluem o tempo e o esforço necessários (THOMAS; FRANCIS, 1996; FAIRWEATHER, 1991).

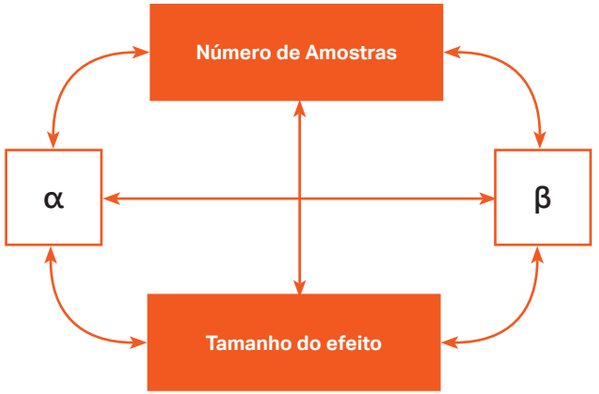


Figura 9.2 Relação entre o número de amostras, o valor de beta, o valor de alfa e o tamanho do efeito. Adaptado de Krebs (1998).

9.2.2 Cálculo do Poder do Teste a priori

Durante o delineamento amostral do programa de MEA sugere-se que sejam efetuados cálculos do poder do teste para determinar corretamente o número de amostras necessárias para detectar o tamanho do efeito crítico (TEC) caso este ocorra.

Com um TEC definido, é baixa a probabilidade de incorrer no erro do tipo I (α) e no erro do tipo II (β) e há o necessário para elaborar uma estratégia de amostragem cientificamente robusta baseada na realidade local e não em tamanhos de amostra definidos de forma arbitrária. A Figura 9.2 representa a relação entre essas quatro características de um delineamento.

Há diversos programas estatísticos que realizam os cálculos de poder do teste necessários para o ajuste correto dos erros do tipo I e II e para a definição do número de amostras necessárias ao monitoramento para detecção dos potenciais efeitos. Faz-se menção ao pacote **pwr** (CHAMPELY *et al*, 2015) que pode ser acessado e utilizado com a plataforma estatística R (CORE TEAM, 2015).

9.3 Entendendo as Definições sobre Efeito e o Significado da Interpretação dos Dados Dentro de um Programa de MEA

Em um programa de MEA, um efeito é geralmente definido como uma diferença estatisticamente diferente do acaso em alguma variável relacionada aos peixes, seu uso econômico ou comunidade de invertebrados bentônicos medida em uma área exposta ao efluente e em outra área de referência ou ao longo de um gradiente de exposição.

Por exemplo, em uma análise de tecidos de peixes coletados próximo ao ponto de lançamento de uma fábrica de celulose e papel (utilizada para determinar seu uso econômico), um efeito é definido como a concentração de dioxinas e furanos, expressa como equivalentes tóxicos de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina que exceda 15 picogramas por grama (pg/g) de peso úmido de músculo ou 30 pg/g de peso úmido de fígado ou hepatopâncreas em peixes na área de exposição ao efluente.

O efeito, assim definido, apresenta diferenças ou gradientes que podem ser cientificamente defendidos, pois refletem mudanças no ecossistema associados ao efluente. Dessa forma é possível utilizar informações detalhadas sobre os efeitos, sobre sua magnitude e extensão geográfica, para um melhor entendimento do ecossistema e manejo dos recursos aquáticos.

9.4 Avaliação e Intepretação dos Dados no Estudo de Peixes

Os dados coletados durante os estudos com as populações de peixes incluem indicadores de crescimento, reprodução e condição que incluem comprimento, peso corporal, o peso de seu fígado (Figura 9.3) ou hepatopâncreas e, se o peixe estiver maduro sexualmente, o peso de seus ovos, fecundidade e peso das gônadas.

O procedimento que deve ser seguido pode ser dividido em três etapas: ① preparativos para a análise, ② estatística descritiva inicial, ③ análise de variância, ④ análise de covariância e ⑤ análise de poder do teste.

As mensurações necessárias nos estudos com peixes, a precisão esperada e a estatística descritiva sugerida podem ser visualizadas na Tabela 9.2. Os indicadores de efeito e os testes estatísticos sugeridos para cada delineamento podem ser encontrados na tabela 9.3. A Tabela 9.4 mostra os valores limite de suporte (para auxiliar na discussão dos efeitos, uma vez que os mesmos sejam detectados).

Tabela 9.2 Mensurações necessárias nas amostragens de peixes, precisão esperada e estatística descritiva.

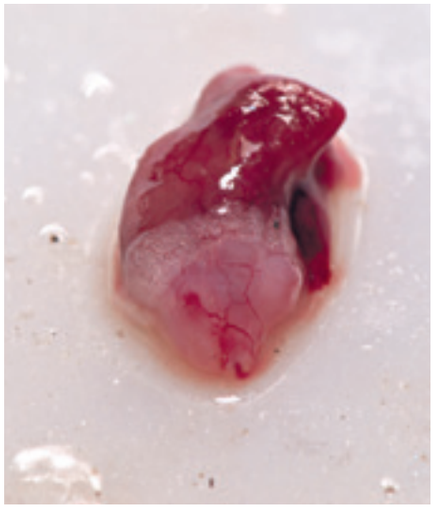
Mensuração necessária	Precisão esperada	Estatística descritiva sugerida
Comprimento	± 1 milímetro	Média, desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos nas áreas amostradas
Peso corporal	± 1%	Média, desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos nas áreas amostradas
Peso da gônada (peixes maduros)	± 0.1 gramas para espécies grandes e 0.001 para espécies pequenas	Média, desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos nas áreas amostradas
Tamanho dos ovos	± 0.001 grama	Peso (recomendado uso de uma subamostra composta por 100 ovos), média, desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos nas áreas amostradas
Fecundidade	± 1%	Número total de ovos por fêmea, média, desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos nas áreas amostradas
Peso do fígado ou hepatopâncreas	± 0.1 gramas para espécies grandes e 0.001 para espécies pequenas	Média, desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos nas áreas amostradas
Condição externa	Não se aplica	Presença de lesões, tumores, parasitas ou outras anormalidades
Sexo	Não se aplica	

Tabela 9.3 Indicadores de efeito e valores limite para vários delineamentos de estudos com peixes e a análise estatística apropriada para cada caso.

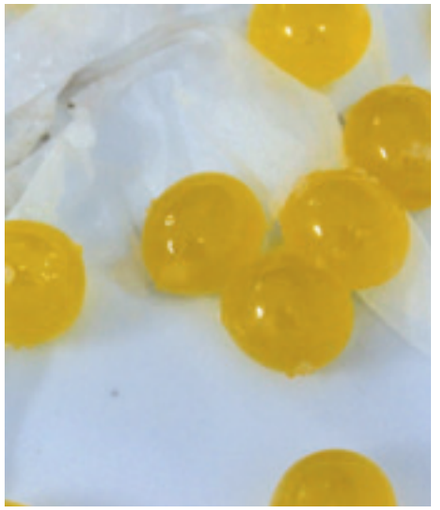
Efeito indicador	Valor limite de cada efeito e procedimento estatístico		
	Amostragem padrão	Amostragem não-letal	Moluscos de vida livre
Crescimento	Tamanho por idade (peso corporal dada a idade) (ANCOVA)	Tamanho (comprimento e peso) no início do ano e no final do período de crescimento (ANOVA)	Peso úmido do animal inteiro
Reprodução	Tamanho relativo da gônada (peso da gônada dividido pelo peso do corpo) (ANCOVA)		Tamanho relativo da gônada (peso da gônada dividido pelo peso do corpo) (ANCOVA)
Condição	Peso do corpo relativo ao comprimento e peso relativo do fígado (peso do fígado pelo peso do corpo) (ANCOVA)	Peso do corpo relativo ao comprimento (ANCOVA)	Peso seco do animal inteiro ou peso da concha ou peso relativo do corpo pelo comprimento da concha (ANCOVA)

Tabela 9.4 Valores limite complementares para uso nas análises de suporte (auxiliares à interpretação dos resultados).

Indicador de efeito	Valor limite	Procedimento estatístico
Uso da energia	Peso corporal total Comprimento	ANOVA
Uso da energia	Tamanho relativo da gônada Fecundidade relativa: # ovos/fêmea contra o peso corporal Fecundidade relativa: # ovos/fêmea contra o comprimento Fecundidade relativa: # ovos/fêmea contra a idade Tamanho relativo do fígado	ANCOVA
Reserva energética	Tamanho relativo dos ovos: média do peso dos ovos contra o peso corporal Tamanho relativo dos ovos: média do peso dos ovos contra a idade	ANCOVA



A



B

C

Figura 9.3 Ⓐ Fígado, Ⓑ Contagem dos ovócitos de *Genidens genidens* Ⓒ Peixe estudado pelo Projeto Peixe Guia.

9.5 Preparativos para as Análises

Após a conclusão das coletas e mensurações em campo e em laboratório, os dados devem ser inseridos em uma planilha eletrônica seguindo os passos que garantam o controle de qualidade. Os valores inseridos na planilha devem ser verificados um a um com as tabelas de campo originais para evitar erros tipográficos.

A matriz de dados deve conter um identificador da localidade (área) e a tabela deve ser organizada de modo que as variáveis estejam em colunas e as observações (amostras) em suas linhas.

É importante incluir uma coluna para comentários sobre a condição física e quaisquer anomalias percebidas durante o processo de amostragem. Recomenda-se também a criação de uma planilha de metadados onde se registre toda e qualquer informação relevante ao entendimento dos dados, tais como uma legenda para as siglas utilizadas e informações sobre dados transformados ou obtidos através de alguma formula.

As análises subsequentes devem ser feitas para cada um dos sexos separados, dadas as diferenças inerentes a essa condição. O mesmo raciocínio se aplica aos peixes que não estão maduros sexualmente.

A maturidade sexual pode ser inferida com uso do índice gonadossomático (IGS) = (peso da gônada / peso corporal) x 100. Como regra geral peixes imaturos tem IGS < 1%.

9.5.1 Estatística Descritiva

Devem ser calculadas e apresentadas as estatísticas descritivas de todas as variáveis mensuradas, como a média, desvio padrão e erro padrão assim como os valores máximos e mínimos dos dados, respeitando a separação entre machos e fêmeas assim como a de adultos e imaturos e local de coleta. O mesmo se aplica às variáveis compostas, como pesos ou tamanhos relativos.

É recomendado, antes dos cálculos, um exame gráfico dos dados para verificação da ausência de erros tipográficos e de valores extremos (*outliers*). Uma sugestão é o uso do gráfico de *boxplot*.

Após a verificação da presença de *outliers*, os dados devem ser testados em relação a sua normalidade e homogeneidade de variâncias.

Os valores extremos (*outliers*) que não sejam erros tipográficos não devem ser removidos de forma automática. É recomendado que sejam feitas análises com e sem a presença dos mesmos no conjunto de dados

para avaliar sua influência (GRUBBS, 1969; GREEN, 1979). Esse procedimento deve constar do relatório interpretativo.

9.5.2 Analise de Variância (ANOVA) e Análise de Covariância (ANCOVA)

Antes de iniciar as análises para verificação da ocorrência ou não de efeitos no programa de monitoramento, os dados devem ser testados em relação ao cumprimento dos pressupostos da ANOVA ou da ANCOVA.

Esses testes são relativamente robustos a pequenos desvios de seus pressupostos. Em alguns casos é recomendado que os dados sejam transformados para se ajustarem a esses pressupostos. Na eventualidade de que mesmo transformados eles não possam ser analisados com esses procedimentos, recomenda-se a adoção de testes não paramétricos. Para maiores discussões sobre o tema, consulte obras clássicas como Sokal e Rohlf (1995) ou Zar (2010).

9.5.2.1 ANOVA

ANOVA é utilizada para testar diferenças nos locais em relação ao peso e comprimento. Os pressupostos da ANOVA são:

- As variáveis populacionais mensuradas no local de referência e no local de exposição tem distribuição normal;
- As variâncias são homogêneas;
- Os erros são independentemente distribuídos.

Uma análise de variância simples (*one-way*) é utilizada para testar diferenças na média da variável resposta (comprimento, peso) utilizando um fator como o local (referência ou exposição).

9.5.2.2 ANCOVA

ANCOVA é utilizada para testar diferenças nos locais em relação à condição, peso relativo das gônadas, peso relativo do fígado, peso em dada idade, tamanho em dada idade e fecundidade relativa.

Os pressupostos da ANCOVA são:

- A relação entre a variável resposta e sua covariável é linear;
- As retas de regressão, calculadas entre locais, são paralelas;
- A covariável é fixa e mensurada sem erro;
- Os resíduos tem distribuição normal, são independentemente distribuídos e possuem media zero e uma variância comum.

A ANCOVA é utilizada para testar diferenças em uma variável resposta entre locais, lavando em consideração a variabilidade de cada amostra ao incluir uma covariável na análise. Isso diminui o erro e aumenta o poder do teste (HUITEMA, 1980).

Nota: para espécies de peixes de pequeno tamanho corporal, a amplitude da covariável (idade) pode se apresentar como sendo algo entre 2 a 3 ou 2 a 4. Uma ANCOVA com apenas 2 ou 3 valores de covariável irá gerar resultados não confiáveis. Nesses casos é mais apropriado realizar uma ANOVA simples sobre o peso corporal, adotando o local de coleta como fator para cada grupo de idade. Há abordagens específicas para lidar com dados cujas inclinações (*slopes*) das curvas não sejam paralelas entre si. Para tal, veja Barrett *et al.* (2010).

9.5.3 Análise dos Resíduos

A melhor forma de realizar uma análise de resíduos é aquela que envolve o uso de gráficos. Há uma recomendação clara no trabalho de Day e Quinn (1989) para adoção desses métodos em detrimento de testes formais. Para maior embasamento, consulte Miller (1986). Uma das vantagens dos métodos gráficos é que elas permitem identificar a causa dos desvios da normalidade ou da homogeneidade de variâncias.

9.5.4 Níveis de Replicação

Para cada análise, ANOVA ou ANCOVA, o nível (ou unidade) de replicação – tamanho da amostra (N) é o número de peixes coletados (por exemplo, número de indivíduos). Na seção sobre o poder do teste será discutido o número ideal de amostras, mas o mínimo recomendado é que a amostra contenha pelo menos 20 peixes sexualmente maduros por cada sexo. Para espécies de pequeno tamanho corporal, recomenda-se que sejam coletados mais 20 indivíduos adicionais sexualmente imaturos. Esse número de amostras refere-se ao valor por cada local de amostragem.

9.6 Levantamento e Interpretação dos Dados para Estudos da Comunidade de Invertebrados Bentônicos

Os dados coletados através da amostragem da comunidade de invertebrados bentônicos deverão ser utilizados para determinar os seguintes indicadores de efeito:

- densidade total de invertebrados bentônicos;
- índice de equitabilidade;
- riqueza dos táxons;
- índice de similaridade (preferencialmente o índice de Bray-Curtis).

Os indicadores de efeito acima devem ser utilizados para determinar diferenças estatísticas significativas entre a área de exposição ao efluente e ao longo do gradiente de exposição. Para cada local de coleta devem ser apresentados a média, desvio padrão, erro padrão e valores mínimos e máximos desses valores limites.

9.7 Delineamento do Estudo e Procedimentos Estatísticos

A Tabela 9.5 descreve os procedimentos estatísticos apropriados que são aplicáveis para a análise de cada um dos delineamentos de estudo recomendados. Estes procedimentos são dependentes de cada um dos sete tipos de delineamento que podem ser empregados.

Tabela 9.5 Procedimentos estatísticos utilizados para determinar um efeito para cada um dos 7 delineamentos passíveis de serem empregados em um programa de monitoramento de efeitos ambientais.

Delineamento	Procedimento estatístico
Controle-impacto (C-I) Múltiplos controles e impacto (MC-I) Antes e depois do impacto (BACI)	ANOVA
Gradiente simples (GS) Gradiente radial (GR)	Regressão / ANOVA
Gradiente múltiplo (GM)	ANCOVA
Condições de referência (CR)	Multivariadas / ANOVA

9.8 Utilização de Condições de Referência

O conceito fundamental de um delineamento que utiliza condições de referência é o estabelecimento de um banco de dados alimentado por pontos de amostragem nos quais as variáveis ambientais e biológicas são mensuradas. Esse banco de dados é utilizado no desenvolvimento de modelos preditivos que visam associar as variáveis ambientais às condições biológicas (BAILEY; NORRIS; REYNOLDSON, 2003)

Esses modelos preditivos permitem que, após a mensuração de determinada variável ambiental em um novo ponto, sejam previstas quais as condições biológicas esperadas para este. A avaliação da ocorrência de um efeito em um ponto de amostragem é feita através da comparação das condições biológicas presentes nesse ponto com todos os valores referência.

Nota: o banco de dados com os valores referência é construído através de protocolos padronizados de amostragem de dados que podem ser realizados em diferentes escalas espaciais.

Uma abordagem alternativa para interpretação de dados foi proposta por Kilgour, Somers e Matthews (1998) na qual a variabilidade presente nos dados é utilizada para definir uma variação normal do sistema para observações esperadas em indivíduos (BARRETT; HILLE; SHARPE, 2015) ou em populações (ARCISZEWSKI; MUNKITTRICK, 2015). Os limites dessa variação podem ser ajustados à medida que novos dados se tornem disponíveis nos ciclos posteriores de monitoramento.

9.9 Valores Limites Complementares (de Suporte)

Os seguintes valores limites devem ser registrados e apresentados com suas médias, desvios-padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos e tamanho da amostra:

- Índice de diversidade de Simpson;
- Densidade de cada táxon (ex. Família);
- Proporção de cada táxon;
- Presença ou ausência de cada táxon.

Diferentemente dos valores limites anteriormente discutidos para detecção de efeitos (como a densidade total de invertebrados bentônicos, o índice de equitabilidade, a riqueza de táxons e o índice de similaridade), essas variáveis listadas acima são entendidas como sendo apenas de suporte,

ou seja, não são submetidas às analises estatísticas para determinação de efeitos. Elas devem ser utilizadas como auxiliares nas discussões sobre magnitude e causas de efeitos, caso estes sejam detectados.

9.10 Considerações Finais e Recomendações para Programas de Monitoramento de Efeitos Ambientais

A elaboração, execução e interpretação de um programa de MEA não deve ser encarado como uma receita simples aplicável a qualquer condição que se encontre.

As leis ambientais brasileiras são consideradas umas das mais completas. No entanto, dada sua natureza regulatória, elas apresentam um grau de resiliência que, apesar de compreensível e necessária, não acompanha a velocidade na qual o conhecimento científico gerado se acumula sobre os temas que as leis versam.

Um reflexo não desejado disso é que tanto os profissionais envolvidos em atividades de consultoria ambiental quanto os que atuam nos órgãos de controle e fiscalização ambiental tendem a se apegar a delineamentos, metodologias e técnicas que podem não ser os mais eficientes ou aplicáveis para determinada situação (tais como alguns índices ecológicos sabidamente não informativos, técnicas cujos pressupostos são impossíveis de serem cumpridos sob condições de campo etc.).

Esse distanciamento dos que geram conhecimento para aqueles que o aplicam no meio ambiente de forma direta e reguladora deve diminuir.

A abordagem sugerida neste guia visa, entre outros objetivos, integrar todos os participantes de um MEA nesse processo. Cada nova coleta de campo, cada ciclo de amostragem é utilizado como base de discussão para novos ajustes e melhorias das técnicas empregadas tais como:

- Ajustes metodológicos, tais como novos métodos de coleta de algum grupo específico;
- Novos cálculos de poder do teste e ajustes do número de amostras necessárias;
- Melhor compreensão e ajuste dos limites de variação natural do sistema;
- E a atribuição de causa e responsabilidades (assim como possíveis soluções) caso algum efeito nocivo ao ambiente e aos animais que o habitam seja detectado.

E que o verdadeiro objetivo final de um MEA seja cumprido: que nosso uso dos recursos naturais seja um processo que possa ser mantido a longo prazo sem danos ao meio ambiente.

No Canadá, os próximos passos (Tabela 9.6) a serem seguidos após um ciclo de MEA já estão estabelecidos e serão aqui apresentados como exemplo potencial a ser utilizado no Brasil.

Tabela 9.6 Etapas potenciais a serem utilizadas num programa de MEA (adaptado de ENVIRONMENT CANADA, 2011).

Etapa	Exemplo	Questão	Frequência
Baseline		Qual é o nível de mudanças que queremos avaliar?	3 a 5 anos com intervalos regulares
Básica		Existem efeitos ambientais?	Regular
Confirmação	Efeitos observados estão acima da variabilidade natural?	Pode ser confirmado?	Coletas mais frequentes
Alterações mínimas	Ausência de preocupação confirmada?	Qual é o background atual?	Coletas menos frequentes
Extensão	Efeitos confirmados e ponto referência adequado?	Qual é a extensão e magnitude dos efeitos?	Mais pontos amostrais e novos indicadores devem ser inseridos
Causa	Mudanças observadas em uma área ou está piorando temporalmente?	Qual é a causa dos efeitos?	Deve-se realizar pesquisa focada para buscar a causa
Preocupação	Efeitos excedem a relevância ecológica?	Qual é a solução? É necessário mitigar ou compensar?	

FIGURAS E TABELAS

1 Visão geral do modelo de monitoramento ambiental

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 1.1 Mapa com localização dos pontos amostrais do Projeto Peixe Guia realizado nos rios Benevente, Jucu e Santa Maria da Vitória – Brasil. [Reinaldo Baldotto] **p25**
Figura 1.2 Foto do Rio Jucu – ES em período de chuva, dezembro de 2013. [Leonardo Merçon] **p27**
Figura 1.3 Foto do estuário do Rio Santa Maria da Vitória – ES. [Leonardo Merçon] **p27**
Figura 1.4 Pesquisadores da Universidade de New Brunswick e da Environment Canada, orientadores do Projeto Peixe Guia. Na foto, da esquerda para direita: Dra. Paulina Bahamonde, Dr. Ervin Mark McMaster, Dra. Joanne Parrott e Dr. Mark Hewitt conhecendo informações sobre os estuários capixabas. [Leonardo Merçon] **p28**
Figura 1.5 Apresentação do Dr. Mark McMaster sobre o Modelo de Monitoramento de Efeitos Ambientais da Environment Canada em Vitória – ES. Dezembro de 2013. [Leonardo Merçon] **p28**
Figura 1.6 Apresentação do Dr. Mark Hewitt sobre os parâmetros importantes para avaliar a saúde dos peixes, segundo Modelo de Monitoramento Ambiental da Environment Canada. Dezembro de 2013. [Leonardo Merçon] **p30**
Figura 1.7 Aula prática, liderada pela pesquisadora Dra. Joanne Parrott da Environment Canada, para avaliação da saúde dos peixes no laboratório da UVV. Participação de profissionais da APLYSIA, Cesan, Semmam e UVV. Dezembro de 2013. [Leonardo Merçon] **p30**
Figura 1.8 Diagrama de decisão para auxiliar a identificação de um caminho apropriado dentro do programa de EEM (ENVIRONMENT CANADA, 2012). **p38**
Tabela 1.1 Indicadores de efeitos e *endpoints* avaliados no levantamento da população de peixes. **p33**
Tabela 1.2 Indicadores de efeito e *endpoints* para levantamento da comunidade de invertebrados bentônicos. **p34**
Tabela 1.3 Tamanho do Efeito Crítico (TEC) para avaliação dos efeitos ambientais. **p36**

2 Revisão dos efeitos ambientais causados pela poluição industrial, doméstica e agrícola

Abertura [Priscylla Pavione]
Figura 2.1 Cais da comunidade da Ilha das Caieiras, Vitória – ES. [Leonardo Merçon] **p49**
Figura 2.2 Grupos estressores em ambientes aquáticos, baseado no modelo de Rudneva (2014). **p51**
Figura 2.3 Fígado de *Sphoeroides testudineus* (baiacu). [Priscylla Pavione] **p52**
Figura 2.4 Gonâda de *Ophioscion punctatissimus*, uma das espécies utilizadas como bioindicadoras no Projeto Peixe Guia. [Priscylla Pavione] **p52**
Figura 2.5 O estresse oxidativo nada mais é que a produção excessiva ao acumulo de espécies reativas de oxigênio no interior da célula, como ânion superóxido (O2-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxilos (OH). As ERO reagem com proteínas com material genético e inativam enzimas, baseado em Reyes *et al.* (2015). **p54**
Figura 2.6 Modelo de bioacumulação e bioconcentração em peixes, baseado em Manaban (1991). **p54**
Figura 2.7 Foto do Porto de Vila Velha – ES tirada pelo projeto Peixe Guia. [Leonardo Merçon] **p57**

3 Delineamento do estudo e caracterização do local

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 3.1 Caracterização do local e escolha dos pontos de coleta. Projeto Peixe Guia. [Joarley Rodrigues] **p69**
Figura 3.2 Coleta piloto para inventariar as espécies de peixes sentinelas no estuário do Rio Benevente, em Anchieta – ES, e escolha das espécies sentinelas usadas no Projeto Peixe Guia. [Joarley Rodrigues] **p73**
Tabela 3.1 Informações necessárias para caracterização do local e delineamento do MEA. [Environment Canada, 2010] **p70**

4 Efeitos nos peixes e nos recursos pesqueiros

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 4.1 Definição dos locais de monitoramento da ictiofauna nos estuários dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu, Projeto Peixe Guia, com a colaboração dos pescadores locais, especialistas da área, agência ambiental e empresas. [Leonardo Merçon] **p101**
Figura 4.2 Bagre (*Genidens genidens*), utilizado como bioindicador nos estuários dos rios de Santa Maria, Jucu e Benevente no Projeto Peixe Guia. [Priscylla Pavione] **p102**
Figura 4.3 Cangoá (*Ophioscion punctatissimus)*, utilizado como bioindicador no estuário do Rio Benevente no Projeto Peixe Guia. [Leonardo Merçon] **p102**
Figura 4.4 Moréia *(Eleotris pisonis)*, utilizado como bioindicador no estuário do Rio Santa Maria da Vitória no Projeto Peixe Guia. [Priscylla Pavione] **p103**
Figura 4.5 Amboré (*Bathygobius soporator)*, utilizado como bioindicador no estuário do Rio Santa Maria da Vitória no Projeto Peixe Guia. [Joarley Rodrigues] **p103**
Figura 4.6 Pescador e estudante auxiliando nas atividades de coleta de peixes com redes de espera no estuário do Rio Benevente, localizado no município

de Anchieta – ES. Projeto Peixe Guia. [Joarley Rodrigues] **p106**
Figura 4.7 Padronização dos artefatos de pesca. [Ⓐ Leonardo Merçon, ⒷⒹ Joarley Rodrigues, Ⓒ Priscylla Pavione] **p109**
Figura 4.8 Procedimento em laboratório para retirada dos orgãos dos peixes. Ⓐ Retirada de tecidos Ⓑ Gônada da fêmea de cangoá, Ⓒ Fígado, Ⓓ Gônada de fêmea de bagre. [Ⓐ Leonardo Merçon, ⒷⒸ Joarley Rodrigues, Ⓓ Priscylla Pavione] **p113**
Figura 4.9 Pesagem das gônadas e medição dos ovócitos. [Ⓐ Joarley Rodrigues, Ⓑ Leonardo Merçon] **p115**
Figura 4.10 Filetagem dos tecidos de peixes e de moluscos. [Ⓐ Joarley Rodrigues, Ⓑ APLYSIA] **p126**
Tabela 4.1 Fatores biológicos e sociais a serem considerados para seleção das espécies-sentinela. **p100**
Tabela 4.2 Medições requisitadas em estudos de levantamentos de peixes para MEA, suas precisões específicas e resultados que devem ser gerados. **p118**
Tabela 4.3 Estruturas sugeridas para análise de determinação de idade em peixes brasileiros. **p119**
Tabela 4.4 Limite máximos de contaminantes em peso úmido estabelecidos pela Resolução Anvisa nº 42/2013 e Decreto nº 55.871/6195. **p127**

5 Efeitos no habitat: comunidade de invertebrados bentônicos

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 5.1 Exemplo de amostrador utilizado nas coletas da comunidade bentônica. (APLYSIA) **p139**
Figura 5.2 Organismos mais abundantes encontrados nas coletas do Projeto Peixe Guia. Ⓐ Molusco bivalve *Anomalocardia brasiliensis*; Ⓑ *Polychaeta* Família *Nereididae*; Ⓒ *Tanaidacea Monokalliapseudes schubarti*. [Karla Costa] **p151**

6 Caracterização de efluentes e monitoramento da qualidade da água

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 6.1 Fluxograma apresentando a sequência dos procedimentos de amostragem e análise laboratorial. **p159**
Figura 6.2 Visitas a campo para definição dos pontos de coleta do Projeto Peixe Guia realizado no Rio Jucu e no estuário do Rio Santa Maria da Vitória – ES. Dezembro/2013. [Leonardo Merçon] **p163**
Figura 6.3 Formulário padronizado utilizado para as anotações de campo tomadas durante as coletas de água e sedimento do Projeto Peixe Guia. [Joarley Rodrigues] **p167**
Figura 6.4 Garrafa de Van Dorn utilizada para coleta de água em diferentes profundidades. Amostra coletada sendo acondicionada em frasco devidamente etiquetado. [APLYSIA] **p169**
Figura 6.5 Disco de Secchi. [APLYSIA] **p169**
Tabela 6.1 Armazenamento e preservação de amostras para análises fisico-químicas. **p171**

7 Ensaios ecotoxicológicos crônicos

Abertura [APLYSIA]
Figura 7.1 Exemplos de organismos teste utilizados em ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos no Brasil. Ⓐ *Daphnia similis*, Ⓑ *Danio rerio*, Ⓒ *Mysidopsis juniae*, Ⓓ *Echinometra lucunter*. [APLYSIA] **p201**
Tabela 7.1 Ensaios ecotoxicológicos crônicos normatizados pela ABNT. **p196**

8 Monitoramento do sedimento

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 8.1 Amostrador tipo garra utilizado para coleta de bentos e de sedimento. [APLYSIA] **p210**
Figura 8.2 Amostra de sedimento coletada para avaliação da comunidade de invertebrados bentônicos. [Priscylla Pavione] **p211**
Tabela 8.1 Classificação do tamanho das partículas de sedimento. **p215**

9 Avaliação dos dados e interpretação

Abertura [Leonardo Merçon]
Figura 9.1 Mapa conceitual sobre as informações gerais que devem ser incluídas no relatório interpretativo ao final de cada ciclo de monitoramento. [Leonardo Merçon] **p225**
Figura 9.2 Relação entre o número de amostras, o valor de beta, o valor de alfa e o tamanho do efeito. Adaptado de Krebs (1998). **p228**
Figura 9.3 Ⓐ Fígado, Ⓑ Contagem dos ovócitos de *Genidens genidens* Ⓒ Peixe estudado pelo Projeto Peixe Guia. (APLYSIA) **p232**
Tabela 9.1 Os dois tipos de erros estatísticos presentes em testes de hipóteses. Adaptado de Zar (2010). **p226**
Tabela 9.2 Mensurações necessárias nas amostragens de peixes, precisão esperada e estatística descritiva. **p230**
Tabela 9.3 Indicadores de efeito e valores limite para vários delineamentos de estudos com peixes e a análise estatística apropriada para cada caso. **p231**
Tabela 9.4 Valores limite complementares para uso nas análises de suporte (auxiliares à interpretação dos resultados). **p231**
Tabela 9.5 Procedimentos estatísticos utilizados para determinar um efeito para cada um dos 7 delineamentos passíveis de serem empregados em um programa de monitoramento de efeitos ambientais. **p236**
Tabela 9.6 Etapas potenciais a serem utilizadas num programa de MEA (adaptado de ENVIRONMENT CANADA, 2011). **p239**

ÍNDICE REMISSIVO

A

alimentação 50, 95, 110, 116, 117, 120, 198
análises químicas 32, 207, 209
ANCOVA 74, 221, 231, 234, 235, 236
anomalias 119, 233
ANOVA 74, 148, 221, 231, 234, 235, 236
área de referência 75, 76, 77, 83, 85, 86, 87, 96, 97, 125, 135, 229
área referência 32, 33, 34, 35, 36, 77, 85, 96, 97, 99, 122, 123, 147, 207

B

Benevente 25, 29, 73, 100, 102, 106, 108, 110, 149
bioacumulação 54, 55, 124

C

caracterização do habitat 72
carbono 32, 122, 133, 164, 177, 192, 207, 215, 216
comunidade bentônica 31, 37, 77, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 140, 145, 147, 148, 149, 215
comunidade de invertebrados bentônicos 32, 33, 34, 35, 73, 77, 83, 84, 86, 133, 142, 146, 147, 148, 207, 211, 224, 229, 236
Conama 23, 24, 157, 158, 162, 188
condições de crescimento 95
conteúdo estomacal 55, 120
controle de qualidade 37, 66, 67, 105, 106, 140, 162, 166, 172, 173, 174, 233

D

delineamento 65, 66, 68, 69, 70, 74, 75, 84, 85, 88, 96, 97, 104, 107, 117, 121, 123, 164, 224, 225, 227, 228, 229, 236, 237
densidade 58, 71, 133, 145, 162, 213, 236, 237

E

ecotoxicidade 31, 83, 188, 194, 224
efeitos biológicos 31, 32, 34, 55, 57
efeitos subletais 120
efluente 26, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 50, 51, 53, 66, 69, 70, 71, 72, 74, 76, 77, 83, 84, 85, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 111, 116, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 133, 134, 135, 147, 148, 157, 162, 164, 175, 176, 188, 189, 190, 194, 195, 196, 207, 216, 224, 229, 236
ensaios ecotoxicológicos 37, 55, 57, 120, 187, 188, 193, 196, 201
espécies bioindicadoras 29, 99, 189
espécies sentinelas 33, 73, 96, 104, 105, 108, 120

F

fator de condição 50, 93, 119, 120
fígado 33, 36, 50, 53, 55, 111, 118, 119, 120, 124, 125, 224, 229, 230, 231, 234

G

gônada 33, 50, 55, 116, 230, 231, 233
granulometria 32, 181, 207, 215

I

ictiofauna 83, 95, 96, 99, 101
IGS 50, 51, 120, 121, 233
IHS 50, 120, 121
índice de condições 55
índice gonadossomático 50, 55, 233
índice hepatossomático 50, 55
índices hepatossomático 120
invertebrados bentônicos 32, 33, 34, 35, 56, 58, 70, 73, 77, 83, 84, 86, 130, 133, 134, 140, 142, 143, 144, 146, 147, 148, 207, 211, 224, 229, 236, 237

J

Jucu 25, 27, 29, 100, 101, 102, 108, 149, 163

L

lançamento de efluente 33, 51, 97

M

meio ambiente 23, 157, 194, 238, 239
metais 49, 55, 79, 110, 124, 127, 164, 166, 172, 176, 177, 187, 192, 215, 216
metal 55, 215
monitoramento ambiental 20, 23, 29, 34, 36, 48, 65, 66, 144, 149, 157, 193, 216
monitoramento biológico 23, 31, 35, 37, 38, 39, 58, 65, 66, 87, 157, 161, 214
Monitoramento de Efeitos Ambientais 21, 26, 28, 36, 55, 68, 95, 187, 223, 238

P

Peixe Guia 21, 24, 25, 28, 29, 52, 57, 69, 73, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 108, 149, 151, 163, 167, 232
poder do teste 123, 148, 225, 226, 227, 228, 229, 235, 238

Q

qualidade de água 23, 48, 157, 165, 172, 177

R

recurso hídrico 29, 95
recurso pesqueiro 95
recursos hídricos 23, 24, 29, 47, 74, 86, 157
referência 26, 32, 33, 34, 35, 36, 56, 66, 69, 70, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 96, 97, 98, 99, 118, 121, 122, 123, 125, 127, 133, 134, 135, 136, 140, 141, 144, 147, 148, 166, 172, 174, 196, 207, 227, 229, 234, 236, 237, 239
reprodução 31, 33, 50, 95, 99, 111, 116, 117, 120, 190, 191, 197, 229
reserva energética 119
riqueza 34, 36, 50, 58, 77, 78, 133, 145, 149, 236, 237

S

Santa Maria da Vitória 25, 27, 29, 100, 101, 103, 108, 110, 163
sedimento 31, 32, 37, 39, 56, 57, 58, 73, 77, 80, 81, 116, 124, 133, 137, 138, 140, 143, 146, 148, 149, 167, 187, 188, 194, 196, 204, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217
sobrevivência 31, 33, 95, 111, 116, 143, 188, 190, 191, 197, 199

T

tecidos de peixe 125
tecidos de peixes 38, 55, 126, 127, 229

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1 Visão geral do modelo de monitoramento ambiental

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (Brasil) (ANA). **Programa Nacional de Qualidade das Águas**. Disponível em: <http://portalpnqa.ana.gov.br/pnqa.aspx>. Acesso em: 09 out. 2015.

BUSS, D.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAPTISTA, D. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, 2008, v. 12, n. 3, p. 339-345.

CHIANG, G. *et al.* Health status of native fish (Percilia gillissi and Trichomycterus areolatus) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2011, v. 3.

CHIANG, G. *et al.* Monitoring of the Environmental Effects of Pulp Mill Discharges in Chilean Rivers: Lessons Learned and Challenges. **Water Quality Research Journal of Canada**, 2010, v. 45, n. 2, p. 111-122.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil) (CONAMA). Resolução Conama nº 274/2000, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 nov. 2000, n. 018, p. 70-71.

_____. Resolução nº 357/2005, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 mar. 2005, n. 053, p. 58-63.

_____. Resolução nº 430/2011, de 16 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 mai. 2011, n. 92, p. 89.

DIRECTIVE 2000/60/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. **Official Journal of the European Communities**. 3 out. 2000. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0004.02/DOC_1&format=PDF>. Acesso em: 9 out. 2014.

ECOMETRIX. Cumulative impact study Uruguay pulp mills. International Finance Corporation (IFC), **World Bank Group**, Washington, DC, USA, 2006.

ENVIRONMENT CANADA. **Metal Mining Technical Guidance for Environmental Monitoring**. 2012, 550 p.

_____. Pulp and paper environmental effects monitoring guidance document. EEM. **National Environmental Effects Monitoring Office**, Environment Canada. Gatineau, QC, 2005.

_____. **Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document**. 2010, 481 p.

GRAY, M.A.; CURRY, R.A.; MUNKITTRICK, K.R. Non-lethal sampling methods for assessing environmental impacts using a small-bodied sentinel fish species. **Water Quality Research Journal Of Canada**, 2002, v. 37, p. 195-211.

HALL, T.J. *et al.* A Long-Term, Multitrophic Level Study to Assess Pulp and Paper Mill Effluent Effects on Aquatic Communities in Four US Receiving Waters: Lessons Learned. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 2009, v. 5, n. 2, p. 283-290.

HALL, T.J.; LANDIS, W.G. Introduction to Special Series: Measurement and Analysis of the Potential Long Term Impact of Pulp and Paper Mill Effluent on Receiving Waters. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 2009, v. 5, p. 186-188.

HEUVEL, M.R. *et al.* Review of reproductive-endocrine effects in a New Zealand pulp and paper mill effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2006, v. 65, p. 314–322.

HEWITT, L.M. *et al.* Investigation of cause in pulp and paper environmental effects monitoring. **Water Quality Research Journal Of Canada**, 2005, v. 40, n. 3, p. 261-274.

HEWITT, L.M. *et al.* Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: Roles of individual compounds and mill operating conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2008, v. 27, n. 3, p. 682-697.

KEOUGH, M.J.; MAPSTONE, B.D. Designing environmental monitoring for pulp mills in Australia. **Water Science and Technology**, 1997, v. 35, p. 397-404.

MARTEL, P.H. *et al.* Effluent monitoring at a bleached kraft mill: Directions for best management practices for eliminating effects on fish reproduction. **Journal of Environmental Science and Health**, 2011, v. 46, n. 8, p. 833-843.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 dez. 2011, n. 59, p. 39.

MUNKITTRICK, K.R. *et al.* A review of potential methods for determining critical effect size for designing environmental monitoring programs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2009, v. 28, p. 1361-1371.

MUNKITTRICK, K.R.; MCMASTER, M.E.; COURTENAY, S.C. Scientific concepts associated with the continued development and improvement of the. **Canadian Environmental Effects Monitoring Regulation**, 2005, v. 40, n. 3, p. VII-VIII.

ORREGO, R. *et al.* Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio River, Chile. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2006, v. 25, n. 9, p. 2280-2287.

PALACE, V.P. *et al.* Caging small-bodied fish as an alternative method for environmental effects monitoring (EEM). **Water Quality Research Journal of Canada**, 2005, v. 40, n. 3, p. 328-333.

SERVOS, M.R. *et al.* Comparative assessment of the toxic effects from pulp mill effluents to marine and brackish water organisms (Sweden) In**: Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents**. Eds.: Delray, Florida, 1996, p. 95-105.

SUMITH, J.A.; MUNKITTRICK, K.R. Study design considerations for assessing the health of fish populations impacted by agriculture in developing countries: a Sri Lankan case study. **Journal of Environmental Monitoring**, 2011, v. 13, n. 8, p. 2069-2336.

SVANBERG, O.; BENGTSSON, B.E. Impact of bleached pulp mill effluents on the aquatic environment (The Swedish Environment/Cellulose Project) — a case study. **Resources, Conservation and Recycling**, 1996, v. 16, p. 189-199.

WALKER, S.L.; LOWELL, R.B.; SHERRY, J.P. Preliminary analysis of pulp and paper environmental effects monitoring data to assess possible relationships between the sublethal toxicity of effluent and effects on biota in the field. **Water Quality Research Journal of Canada**, 2005, v. 40, n. 3, p. 251-260.

2 Revisão dos efeitos ambientais causados por poluentes industriais, domésticos e agrícolas

ADAMS, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **American Fisheries Society**, 2002, v. 4, p. 111-136.

ARCHELA, E. *et al.* Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. **Geografia**, 2003, v. 12, p. 1.

BARBOLA, I.F. *et al.* Avaliação da comunidade de macroinvertebrados aquáticos como ferramenta para o monitoramento de um reservatório na bacia do Rio Pitangui, Paraná, Brasil. **Série Zoologia**, 2011, v. 101, n. 1-2, p. 15-23.

BOLOGNESI, C. *et al.* Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, 2006, v. 78, p. 93-98.

BOLS, N.C. *et al.* Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, 2001, v. 25, p. 853-873.

BOWRON L.K. *et al.* Responses of white sucker (*Catostomus commersoni*) to 20 years of process and waste treatment changes at a bleached kraft pulp mill, and to mill shutdown. **Aquatic Toxicology**, 2009, v. 95, p. 117-132.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J.R.J.F.; MORENO, P. **Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores**. 2010. Disponível em: <http://www.manuelzao.ufmg.br/assets/files/Biblioteca_Virtual/invertaquaticos.pdf>. Acesso em: 06 set. 2015.

CHAIM, A. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: SILVA, C.M.M.S., FAY E.F. **Agrotóxicos & Ambiente**. Brasília: Embrapa, 2004, 289 p.

CHIANG, G. *et al.* Health status of native fish (*Percilia gillissi* and *Trichomycterus areolatus*) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2011, v. 30, n. 8, p. 1793-809.

CHIANG, G. *et al.* Regional Cumulative Effects Monitoring Framework: Gaps and Challenges for the Biobío River Basin in South Central Chile. **Gayana**, 2014, v. 78, n. 2, p. 109-114.

CHIANG, G. *et al.* Monitoring of the Environmental Effects of Pulp Mill Discharges in Chilean Rivers: Lessons Learned and Challenges. **Water Quality Research Journal of Canada**, 2010, v. 45, n. 2, p. 111–122.

CHOI, M. *et al.* Butytin contamination in industrialized bays associated with intensive marine activities in Korea. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2009, v. 57, n. 1, p. 77-85.

CHRISTENSES, G.M.; TUCKER, J.H. Effects of selected water toxicants on the in vitro activity of fish carbonic anhydrase. **Chemical Biological Interactions**, 1976, v. 13, p. 181-192.

COPKIN, E.; ALTINOK, I. Effects of chronic carbosulfan exposure on liver antioxidantenzyme activities in rainbow trout. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2013, v. 36, p. 80-87.

COSTA, M.B. *et al.* Differential organotin sensitivity in two species from a ship traffic area in southeastern Brazil. **Marine Biology Research**, 2014, v. 10, p. 712-724.

DAY, S., CHOUDHURY, M.D., DAS, S. A review on toxicity of paper mill effluent on fish. Bull. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, 2013, v. 2, n. 3, p. 17-23.

ECOTUMUCUMAQUE. Programa de monitoramento de invertebrados aquáticos, In: **Estudo de Impacto Ambiental do Aproveitamento Hidrelétrico Cachoeira Caldeirão**. Macapá-AP, 2013.

ENVIRONMENTAL PROTECTION DEPARTMENT. **Condition Factor (CF), Hepatosomatic Index (HSI) and Gonadosomatic Index (GSI) of fish.** The Government of The Hong Kong Special Administrative Region of The People's Republico of China. 2005. Disponível em: <www.epd.gov.hk/epd/mobile/english/environmentinhk/water/marine_quality/bio_cf05_archive.html>. Acesso em: 7 out. 2015.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; D'ANGELO, A.M.P. Effects of carboryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2007, n. 88, p. 134-142.

GODOI, A.F.L.; FAVORETO, R.; SILVA, M.S. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, 2003, v. 26, n. 5, p. 708-716.

GOMES, M.A.F.; BARIZON, R.R.M. **Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil:** cenário 1992/2011. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2014.

LARSSON, P.; OKLA, L.; COLLVIN, L. Reproductive status and lipid-content as factors in pcb, ddt and hch contamination of a population of pike (esox-lucius l). **Environmental Toxicology dnd Chemistry**, 1993, v. 12, n. 5, p. 855-861.

LIMA, J.E.F.W. **Introdução ao gerenciamento de recursos hídricos**. Orgs.: SETTI, A.A., LIMA, J.E.F.W., CHAVES, A.G.M., PEREIRA, I.C. 2. ed. Brasília: Agencia Nacional de Energia Elétrica, Superintendia de Estudos e Informações Hidrológicas, 2000.

LONDRES, F. *et al.* **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011, 190 p.

MANAHAN, S. E. **Toxicological Chemistry**. Michigan: Lewis Publishers, 1991.

MCMASTER, M.E. *et al.* Detailed endocrine assessments of wild fish in the Northern River Basins, Alberta, in Comparison to EEM Monitored. Endpoints. **Water Quality Research Journal of Canada**, 2005, v. 40, n. 3, p. 299-314.

PATHAN, T.S.; SONAWANE, D.L.; KHILLARE, Y.K. Toxicity and behavioural changes in freshwater fish *Rasbora daniconius* exposed to paper mill effluent. **Botany Research International**, 2009, v. 2, n. 4, p. 263-266.

POLO, A.; SCRIMSHAW, M.D. Challenges for the development of a biotic ligand model predicting copper toxicity in estuaries and seas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2012, v. 31, n. 2, p. 230-238.

REYES, N.S.J. *et al.* NSAID-manufacturing plant effluent induces geno – and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). **Science of the Total Environment**, 2015, v. 530, n. 53, p. 1-10.

RUDNEVA, I. **Stress Response in Fish**. Biomarkers for Stress in Fish Embryos and Larvae. CRV Press. 2014, p. 6, 220p.

SADEKARPAWAR, S.; PARIKH, P. Gonadosomatic and Hepatosomatic Indices of Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus* in Response to a Plant Nutrient. **World Journal of Zoology**, 2013, v. 8, n. 1, p. 110-118.

SOUSA, E.C.P.M. *et al.* Review of ecotoxicological studies of the marine and estuarine environments of the baixada santista (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, 2014, v. 62, n. 2, p. 133-147.

TILEY-O'NEAL, C.P.; MUNKITTRICK, K.R.; MACDONALD, B.A. The effects of organotins on female gastropods. **Journal of Environmental Monitoring**, 2011, v. 13, p. 2360-2388.

TUCCI, C.E.M. Águas urbanas. **Estudos Avançados**, 2008, v. 22, n. 63, p. 97-112.

UNO, S. *et al.* Interspecies differences in the accumulation of tributyltin and its metabolites under dietary exposure in Sea Perch, *Lateolabrax Japonicus*, and Red Sea Bream, *Pagrus Major*. **Environmental Toxicology**, 2011, v. 26, n. 1, p. 29-36.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2003, v. 13, p. 57-149.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Ed. Rima, 2006.

3 Desenho amostral, caracterização da área, controle de qualidade

ARCISZEWSKI, T.J.; MUNKITTRICK, K.R. Development of an adaptive monitoring framework for long-term programs: An example using indicators of fish health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 2015, v. 11, p. 701-718.

BARRETT, T.J. *et al.* Effects of pulp and paper mill effluent on fish: a temporal assessment of fish health across sampling cycles. **Environmental toxicology and chemistry**, 2010 v. 29, p. 440-452.

BUDD, W.W. *et al.* Stream corridor management in the Pacific Northwest: 1. Determination of stream-corridor widths. **Environmental Management**, 1987, v. 11, p. 587-597.

BUSCH, W.D.N.; SLY, P.G. **The development of an aquatic habitat classification system for lakes**. CRC Press: Boca Raton, 1992, p. 225.

CANADIAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION (CALA). **Code of practice and QA manual for laboratory analysis of sewage treatment effluent in support of the MISA Program**. Draft report prepared for CAEAL and the Ontario Ministry of the Environment by Zenon Environmental Laboratories, 1991.

CONQUEST, L.L., RALPH, S.C., NAIMAN, R.J. Implementation of large-scale stream monitoramento efforts: sampling design and data analysis issues. In LOEB, S.L.; SPACIE, A. **Biological monitoramento of aquatic systems**. Boca Raton (FL): Lewis Publishing, 1994, p. 69-90.

CORKUM, L.D. Patterns of bentic invertebrates assemblages in rivers of northwestern North America. **Freshwater Biology**, 1989, v. 21, p. 191-205.

_____. Responses of chlorophyll a, organic matter and macroinvertebrates to nutrient additions in rivers flowing through agricultural and forested land. **Archiv für Hydrobiologi**, 1996, v. 136, p. 391-411.

_____. Spatial distribution pattern of macroinvertebrates along rivers within and among biomes. **Hydrobiologia**, 1992, v. 239, p. 101-114.

COURTENAY, S.C. *et al.* Quantifying impacts of pulp mill effluent on fish in Canadian marine and estuarine environments: problems and progress. **Water Quality Research Journal of Canada**, 2002, v. 37, p. 79-99.

COWARDIN, L.M. *et al.* **Classification of wetlands and deepwater habitats of the United States**. Washingtin (DC): U.S. Fish and Wildlife Service. FWS/OBS-79/31, 1979.

CUPP, C.E. **Valley segment type classification for forested lands of Washington**. Timber, Fish & Wildlife AM-89-001. Olympia: Washington Forest Protection Association, 1989, p. 42.

DORGERLOH, U. *et al.* How to improve reliability in groundwater analysis: over a decade of experience with external quality control in field campaigns on volatile halogenated compounds. **Journal of Environmental Monitoring**, 2012, v. 14, p. 217-223.

EADIE, J.M.; KEAST, A. Resource heterogeneity and fish species diversity in lagos. **Canadian Journal of Zoology**, 1984, v. 62, p. 1689-1695.

ENVIRONMENT CANADA. **Metal Mining Technical Guidance for Environmental Monitoring**, 2012, p. 550.

_____. **Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document**. 2010, p. 481.

FIELD, S.A. *et al.* Making monitoring meaningful. **Austral Ecology**, 2007, v. 32, p. 485-491.

FIELD, S.A. *et al.* Minimizing the cost of environmental management decisions by optimizing statistical thresholds. **Ecology Letters**, 2004, v. 7, p. 669-675.

FORAN, J.A.; FERENC, S.A. **Multiple stressors in ecological risk and impact assessment**. Pensacola (FL): SETAC Press, 1999.

FRISSELL, C.A. *et al.* A hierarchical framework for stream habitat classification: viewing streams in a watershed context. **Environmental Management**, 1986, v. 10, p. 199-214.

GREEN, R.H. Application of repeated measures designs in environmental impact and monitoramento studies. **Australian Journal of Ecology**, 1993, v. 18, p. 81-98.

HAWKINS, C.P. *et al.* A hierarchical approach to classifying stream habitat features. **Fisheries**, 1993, v. 18, p. 3-12.

HUGHES, R.M. Defining acceptable biological status by comparing with reference conditions. In: DAVIS, W.S.; SIMON, T.P. **Biological assessment and criteria: tools for water resource planning and decision-making**. Boca Raton (FL): Lewis Publishers, 1995, p. 31-47.

HUGHES, R.M. *et al.* C.O. Use of ecoregions in biological monitoring. In: LOEB, S.L.; SPACIE, A. **Biological monitoring of aquatic systems**. Boca Raton (FL): Lewis Publishers, 1994, p. 125-149.

HURLBERT, S.H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological Monographs**, 1984, v. 54, p. 187-211.

HUYSMANS, M.; DASSARGUES, A. Application of multiple-point geostatistics on modelling groundwater flow and transport in a cross-bedded aquifer (Belgium). **Hydrogeology Journal**, 2009, v. 17, p. 1901-1911.

JAMES, L.; OSIENSKY, P.R.; DONALDSON, P.R. A Modified Mise-A'-La-Masse Method for Contaminant Plume Delineation. **Ground Water**, 1994, v. 32, p. 448-457.

JONES, N.E.; PETERMAN, I.C. The capacity to detect change stream fish communities characteristics at the site-level in the lake Ontario basin. **Environmental Management**, 2012, v. 50, p. 77-88.

KERR, S.R.; RYDER, R.A. The applicability of fish yield indices in freshwater and marine ecosystems. **Limnology and Oceanography**, 1988, v. 33, p. 973-981.

KILGOUR, B.W. *et al.* Aquatic environmental effects monitoring guidance for environmental assessment practitioners. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2007, v. 130, p. 423-436.

LEGG, C.J.; NAGY, L. Why most conservation monitoring is, but need not be, a waste of time. **Journal of Environmental Management**, 2006, v. 78, p. 194-199.

MARSHALL, T.R.; RYAN, P.A. Abundance and community attributes of fishes relative to environmental gradients. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 1987, v. 44, p. 196-215.

MAXWELL, J.R. *et al.* **A hierarchical framework of aquático ecological unidades in North America (Nearctic Zone)**. Gen. Tech. Rep. NC-176. St. Paul (MN): U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experimental Station. 1995, p. 72.

MEADOR, M.R. *et al.* Methods for characterizing stream habitat as part of the national water-quality assessment program. Raleigh (NC): U.S. **Geological Survey – Open-File Report**, 1993, p. 93-408.

MONTGOMERY, D.R.; BUFFINGTON, J.M. **Canal classification, prediction of canal response, and assessment of canal condition**. Washington State Timber/Fish/Wildlife Agreement. Report TFW-SH10-93-002. Olympia (WA): Department of Natural Resources, 1993.

MUNKITTRICK, K.R. *et al.* **Development of methods for effects-based cumulative effects assessment using fish populations:** Moose River Project. Pensacola (FL): SETAC Press. XVIII, 2000, p. 236.

NI, H.G.; ZENG, H.; ZENG E.Y. Sampling and analytical framework for routine environmental monitoring of organic pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2011, v. 30, p. 1549-1559.

OEPA. **Ohio Environmental Protection Agency. Ohio Water Resource Inventory. Columbus (OH):** Ohio Environmental Protection Agency, 1990.

OMERNIK, J.M. Ecoregions: a spatial framework for environmental management. In: DAVIS, W.S.; SIMON, T.P. **Biological assessment and criteria. Tools for water resource planning and decision-making**. Boca Raton (FL): Lewis Publishers, 1995, p. 49-62.

PETERJOHN, W.T.; CORRELL, D.L. Nutrient dynamics in an agricultural watershed: observation on the role of a riparian forest. **Ecology**, 1984, v. 65, p. 1466-1475.

RYDER, R.A. A method for estimating the potential fish production of north temperate lakes. **Transactions of the American Fisheries Society**, 1965, v. 4, p. 214-218.

SHANLEY, J.B.; *et al.* Quantity is Nothing without Quality. **BioScience**, 2013, v. 63, p. 574-585.

SIMON, T.P. **Development of biotic integrity expectations for the ecoregions of Indiana**. I. Central Corn Belt Plain. Chicago (IL): U.S. Environmental Protection Agency, Region V, Environmental Sciences Division, Monitorament and Quality Assurance Branch, Environment Monitorament Section. EPA 905/9-91/025, 1991.

SNELGROVE, R.V.R.; BUTMAN, C.A. Animal sedimento relationships revilocald: cause versus effect. **Oceanography and Marine Biology, An Annual Review**, 1994, v. 32, p. 111-178.

TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. Chelsea (MI): Lewis Publishers Inc, 1987.

THORSON, G. Bottom communities (sublitorral or shallow shelf). In Hedgepeth JW, editor. Treatise on marine ecology and paleoecology. Vol 1. **Memoirs of the Geological Society of America**, 1957, v. 67, p. 461-534.

UNDERWOOD, A.J. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge (UK): **Cambridge University Press**, 1997, p. 504.

_____. On beyond BACI: sampling designs that might reliably detect ambientesal disturbances. **Ecological Applications**, 1994, v. 4, n. 1, p. 3-15.

UNDERWOOD, A.J.; CHAPMAN, M.G. **Conservation of coastal organisms depends on scientific realism, not community "monitoring"**. A clash of paradigms: community and research-based conservation, 2002, p. 20-37.

WALKER, S.L. *et al.* **Canadian Environmental Effects Monitoring**: Regulatory Programs. 2003, p. 311-326.

WETZEL, R.G. **Limnology**. Philadelphia (PA): W.B. Saunders Co. 1975, 743 p.

WICKWARE, G.M.; RUBEC, C.D.A. **Ecoregions of Ontario**. Ecological Land Classification. Ottawa (ON): Environment Canada. 1989, v. 26, p. 37.

WIKEN, E. **Terrestrial ecotones of Canada**. Ecological Land Classification Series. Ottawa (ON): Environment Canada. 1986, v. 19.

YODER, C.O. **Answering some concerns about biological criteria based on experiences in Ohio**. In: FLOCK H.G. (Ed.). Water quality standards for the 21st century. Washington (DC): Office of Water, U.S. Ambientesal Protection Agency. 1991, p. 95-104.

_____. **The development and use of biological criteria for Ohio surface waters**. FLOCK H.G. (Ed.). Water quality standards for the 21st century. Washington (DC): Office of Water, U.S. Ambientesal Protection Agency, 1989, p. 139-146.

YOUNG, R.A.; HUNTRODS, T.; ANDERSON, W. Effectiveness of vegetated buffer strips in controlling pollution from feedlot runoff. **Journal of Environmental Quality**, 1980, v. 9, p. 483-497.

4 Efeitos nos peixes e nos recursos pesqueiros

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (Brasil) (ANVISA). Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 ago. 2013, Seção 1, p. 33-35.

AMUNDSEN, P. A.; GABLER, H. M.; STALDVIK, F. J. A new approach to graphical analysis of feeding strategy from stomach contents data – modification of the Costello (1990) method. **Journal of Fish Biology**, 1996, v.48, p.607-614.

ARAÚJO, M.E.; TEIXEIRA, J.M.C.; OLIVEIRA, A.M.E. **Peixes estuarinos marinhos do Nordeste brasileiro: guia ilustrativo**. 1. ed. Fortaleza: Edições UFC/Editora UFPE, 2004, 260 p.

ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R. Dioxinas e furanos: origens e riscos. **Revista de Saúde Pública**, 1999, v. 33, n. 5, p. 523-530.

BARRETT, T.J. *et al.* Reproductive strategies and seasonal changes in the somatic indices of seven small-bodied fishes in Atlantic Canada in relation to study design for environmental effects monitoring. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2015, v. 187.

BARRETT, T.J.; MUNKITTRICK, K.R. Seasonal reproductive patterns and recommended sampling times for sentinel fish species used in environmental effects monitoring programs in Canada. **Environmental Reviews**, 2010, v. 18, n. 5, p. 115-135.

BASILIO, T.H.; GARCEZ, D.S. A pesca artesanal no estuário do rio Curu, Ceará – Brasil: saber local e implicações para o manejo. **Acta Fisheries and Aquaculture**, São Cristóvão, Sergipe, 2014, v. 2, n. 1, p. 42-58.

BEGOSSI, A. Local Knowledge and training towards management. **Environment, Development and Sustainability**, 2008, v. 10, n. 5, p. 591-603.

BRAGA, F.M.S. Estudo entre fator de condição e relação peso-comprimento para alguns peixes marinhos. **Brazilian Journal of Biology**, 1986, v. 46, n. 2, p. 339-346.

BRASIL. Decreto de nº 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 mar. 1965. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D55871.htm>. Acesso em: 5 out. 2015.

ENVIRONMENT CANADA. **Pulp and paper environmental effects monitoring (EEM) technical guidance document**. Canada, 2010.

_____. **Metal mining technical guidance for environmental effects monitoring**. Canada, 2012.

EUROPA. **Regulamento (CE) nº 2375/2001 do Conselho**, de 29 de novembro de 2001, 2001. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32001R2375>. Acesso em: 22 out. 2015.

FIGUEIREDO, J.L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil I, Introdução. Cações, raias e quimeras**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1977, 104 p.

FIGUEIREDO, J.L.; MENEZES, N.A. **Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1978, 110 p.

_____. **Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. III. Teleostei (2)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1980, 90 p.

_____. **Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2000, 116 p.

GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M.S. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla cf. ocellaris* e *Cichla monoculus* Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, Rio Grande – MG/SP. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá: 2003, v. 25, n. 1, p. 79-86.

HITES, R.A. *et al.* Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. **Science**, 2004 v. 303, n. 5665, p. 226–229, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/14815/en>. Acesso em: 15 out. 2015.

LIZAMA, M.A.P.; AMBRÓSIO, A.M. Relação peso-comprimento e estrutura da população de nove espécies da família Characidae na planície de inundação do alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 1999, v. 16, n. 3, p. 779-788.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. V. Teleostei (4). São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 105 p., 1985.

WOOTON, R.J. **Ecology of Teleost Fishes**. 2th Ed. Fish and Fisheries, 1998.

ZAVALA-CAMIN, L.A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. EDUEM, Maringá, 1996, 125 p.

5 Efeitos no habitat dos peixes: comunidade de invertebrados bentônicos

BONADA, N. *et. al.* Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. **Annual Review of Entomology**, 2006, v. 51, p. 495-523.

BURD, B.J.; NEMEC, A.; BRINKHURST, R.O. The development and application of analytical methods in benthic marine infaunal studies. **Advances in Marine Biology**, 1990, v. 26, p. 169-247.

CANFIELD, T.J. *et al.* Use of benthic invertebrates community structure and the Sediment Quality Triad to evaluate metal-contaminated sediment in the upper Clark Fork River, Montana. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 1994, v. 13, n. 12, p. 1999-2012.

CLARKE, K.R.; AINSWORTH, M. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. **Marine Ecology Progress Series**, 1993, v. 92, p. 205-219.

CLARKE, K.R.; WARWICK, R.M. Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Plymouth, **Natural Environmetal Research Council**, 1994, 234 p.

DE GRAVE, S.; WHITAKER, A. Benthic community re-adjustment following dredging of a muddy -maerl matrix. **Marine Pollution Bulletin**, 1999, v. 38, p. 102-108.

ELEFTHERIOU, A.; MCINTYRE, A.D. **Methods for the study of marine benthos**. 3nd Ed. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications, 2005, 418 p.

ELLIOT, J.M. **Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates**. 2nd Ed. London. Freshwater Biological Association, 1979, 157 p.

ENVIRONMENT CANADA. **Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document**. 2010, 481 p.

_____. **Metal Mining Technical Guidance for Environmental Monitoring**. 2012, 550 p.

FIELD, J.G.; CLARKE, K.R.; WARWICK, R.M. A practical strategy for analyzing multispecies distribution patterns. **Marine Ecology Progress Series**, 1982, v. 8, p. 37-52.

GRAY, J.S. *et al.* Detection of initial effects of marine pollution on marine benthos: an example from the Ekofisk and Eldfisk oilfields, North Sea. **Marine Ecology Progress Series**, 1990, v. 66, p. 285-299.

GREEN, R.H. **Sampling design and statistical methods for environmental biologists**. Toronto (ON): John Wiley and Sons, 1979.

LENIHAN, H.S. *et al.* Variation in marine benthic community composition allows discrimination of multiple stressors. **Marine Ecology Progress Series**, 2003, v. 261, p. 63-73.

LOWELL, R.B. *et al.* National response patterns of fish and invertebrates exposed to pulp and paper mill effluents: metabolic disruption in combination with eutrophication and other effects. In: **Pulp and Paper Mill Effluent Environmental Fate and Effects**. BORTON, D.L. *et al.* Eds., DESTECH Publications, Lancaster, PA, 2004, p. 147-155.

SCHWINGHAMER, P. Characteristic size distributions of integral benthic communities. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 1981, v. 38, p. 1255-1263.

_____. Generating ecological hypotheses from biomass spectra using causal analysis: a benthic example. **Marine Ecology Progress Series**, 1983, v. 13, p. 151-166.

SMITH, B.; WILSON, J.B. A consumer's guide to evenness indices. **Oikos**, 1996, v. 76, p. 70-82.

TURRA, A.; DENADAI, M.R. **Protocolos para o Monitoramento de Habitats Bentônicos Costeiros – Rede de Monitoramento de Habitats Bentônicos Costeiros – ReBentos**. 1. ed. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2015, v. 1, p. 258.

UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION (UNESCO). Monitoring biological variables related to marine pollution. **Reports on studies**, 1980, v. 12, p. 22.

WARWICK, R.M. A new method for detecting pollution effects on marine macrobenthic communities. **Marine Biology**, 1986, v. 92, p. 557-562.

_____. Analysis of community attributes of the macrobenthos of Frierfjord/Langesundfjord at taxonomic levels higher than species. **Marine Ecology Progress Series**, 1988a, v. 46, p. 167-170.

_____. The level of taxonomic discrimination required to detect pollution effects on marine benthic communities. **Marine Pollution Bulletin**, 1988b, v. 19, p. 259-568.

WEISBERG, S.B. *et al.* An estuarine benthic index of biotic integrity (B-IBI) for Chesapeake Bay. **Estuaries**, 1997, v. 20, n. 1, p. 149-158.

6 Caracterização do efluente e monitoramento da qualidade da água

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21ª ed. Washington: APHA, 2005, 1082 p.

BRANDÃO, C.J. **Guia Nacional de Coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil) (CONAMA). Resolução Conama nº 274/2000, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 nov. 2000, 18 p.

_____. Resolução nº 357/2005, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília. 17 mar. 2005, 23 p.

_____. Resolução nº 430/2011, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília. 13 mai. 2011, n. 92, p. 89.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2001.

_____. **Guia de Coleta e Preservação de amostras**. São Paulo, 2001. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/variaveis.asp>. Acesso em: 20 ago. 2015.

ENVIRONMENT CANADA. **Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document**. 2010, 481 p.

_____. **Metal Mining Technical Guidance for Environmental Monitoring**. 2012, 550 p.

ENVIRONMENTAL LABORATORY APPROVAL PROGRAM. **Environmental Laboratory Approval Program certification manual**. New York State Department of Health, 1988.

FOWLIE, P.; HART, D.R.; TURLE, R. **Guidance Document for the Sampling and Analysis of Mine Effluents: Final Report. Ottawa (ON)**: Environment Canada, Environmental Protection Service, Minerals and Metals Division. Report EPS2/MM/5, 2001. Disponível em: <http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/Collection/En49-24-1-39E.pdf>. Acesso em: 15 set. 2015.

KEGLEY, S.E.; ANDREWS, J. **Chemistry of water**. National Foundation, USA, 1988, 167 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 mar. 2004. n. 59, Seção 1, p. 266-270.

NIELSEN, L.A.; JOHNSON, D.L. Eds. **Fisheries techniques**. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 1983.

PARRON, L.M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água**. EMBRAPA Florestas, Colombo, PR, 2011. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/doc219.pdf>. Acesso em: 21 set. 2015.

REILEY M. Science, policy, and trends of metals risk assessment at EPA: How understanding metals bioavailability has changed metals risk assessment at U.S. EPA. **Aquatic Toxicology**, 2007, v. 84, n. 2, p. 292-298.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). **Aquatic life ambient freshwater quality criteria—Copper**, EPA-822-F-07-001, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). **Aquatic life ambient freshwater quality criteria—Copper**, EPA-822-F-07-001. Revision, 2007.

7 Ensaios ecotoxicológicos crônicos

ADAMS, W.J.; ROWLAND, C.D. **Handbook of ecotoxicology**. HOFFMAN, D.J. *et al.* (Ed). Second edition, Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.

ADAMS, W.J., Aquatic toxicology testing methods, pp. 25-45. In: HOFFMAM, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J. (eds.), **Handbook of ecotoxicology**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 1995, 663 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS. Environment Federation; **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed., American Public Health Association: Washington, 1998.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. **Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos**. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E (Ed). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos: Rima. 2006, p. 117-152.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)**: NBR 12713. Rio de Janeiro, 2004a.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**: NBR 15088. Rio de Janeiro, 2004b.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com** Ceriodaphnia **spp (Crustacea, Cladocera)**: NBR 13373. Rio de Janeiro, 2005a.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**: NBR 12648. Rio de Janeiro, 2005b.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes**: NBR 15499. Rio de Janeiro, 2007.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)**: NBR 12648. Rio de Janeiro, 2011.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**: NBR 15350. Rio de Janeiro, 2012.

_____. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)**: NBR 13373:2010. Rio de Janeiro, 2014.

BAILER, A.J.; ORIS, J.T. Estimating inhibition concentrations for different response scales using generalized linear models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 1997, v. 16, n. 7, p. 1554-1559.

BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M.V.; MELO S.L.R. Garantia de qualidade e precauções com segurança e saúde em laboratórios de ecotoxicologia aquática. In: NASCIMENTO I.A., SOUSA E.D.C.P.M., NIPPER M (Ed), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. 1997, p. 25-43.

BERTOLETTI, E. **Controle Ecotoxicológico de Efluentes Líquidos no Estado de São Paulo**. 2ª edição. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2013, p. 44.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E. Análise estatística. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E (Ed). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima. 2006, p. 221-249.

BURGER, J. Bioindicators, types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindic**. 2006, v. 1, p. 22-39.

CAPIZZI, T. *et al.* Statistical Considerations in the Evaluation of Chronic Aquatic Toxicity Studies. **Environmental Science & Technology**, 1985, v. 19, p. 35-43.

CHAPMAN, P.M. Presentation and interpretation of Sediment Quality Triad data. **Ecotoxicology**, 1996, v. 5, p. 327-339.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 mai. 2011, n. 92, p. 89.

COSTA, C.R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, 2008, v. 31, n. 7, p. 1820-1830.

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. **Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos**. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. eds. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima. 2006, p. 153-184.

ENVIRONMENT CANADA. **Biological test method: test of larval growth and survival using fathead minnows. Ottawa (ON):** Environmental Technology Centre. Report EPS 1/RM/22, 1992a.

_____. **Biological test method: fertilization assay with echinoids (sea urchins and sand dollars)**. Ottawa (ON): Environmental Technology Centre. Report EPS 1/RM/27, 1992b.

_____. **Biological test method: toxicity tests using the early life stages of salmonid fish (rainbow trout)**. Report EPS 1/RM/28, 2nd ed., July. Ottawa (ON): Environmental Technology Centre, 1998.

_____. **Biological test method: test of reproduction and survival using the Cladoceran Ceriodaphnia dubia. Ottawa (ON):** Environmental Technology Centre. Report EPS 1/RM/21, 2nd edition, 2007a.

_____. **Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga. Ottawa (ON)**: Environmental Technology Centre. Report EPS 1/RM/25, 2nd edition, 2007b.

_____. **Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte Lemna minor**. Ottawa (ON): Environmental Technology Centre. Report EPS 1/RM/37, 2nd edition, 2007c.

_____. **Metal Mining Technical Guidance for Environmental Effects Monitoring. Ottawa (ON)**: Environmental Technology Centre. 2012, 550 p.

_____. **Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document**. 2010, 481 p.

LAUTH, J.R. *et al.* A novel flow-through method for toxicity assessment using *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Water Quality**. 1996, v. 11, p. 335-343.

NASCIMENTO, I.A. Técnicas de coleta, preservação e preparo de amostras líquidas e de sedimento para testes de toxicidade. In: NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.D.C.P.M.; NIPPER, M. (Ed), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. 2002, p. 15-23.

RONCO, A.; BÁEZ, M.C.D.; GRANADOS, Y.P. **Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas** – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; MORALES, G.C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1, 2004.

ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. **Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. In: **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates** ROSENBERG, D.M.; RESH, V.H. (Ed). Chapman and Hall, New York (USA), 1993.

SILVA, D.C.V.R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. Ecologia de reservatórios e interfaces. In: **A Ecotoxicologia no Contexto Atual no Brasil**. SILVA, D.C.V.R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. (Ed). São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015, p. 340-353.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). **Short-term methods for estimating the toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms**. Third edition. Cincinnati (OH): Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency. EPA /600/4-90/027, 1994a.

_____. **Interim guidance on determination and use of water-effect ratios for metals**. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency. EPA 823-B-94-001, 1994b.

_____. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency EPA-821-R-02-012, 2002a.

_____. **Short-term methods for stimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. Forth edition. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency. EPA-821-R-02-13, 2002b.

WALKER, C.H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Inc. 2001, p. 9.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006, p. 452.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed). **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006, p. 452.

8 Monitoramento do sedimento

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th edition. Washington (DC): American Public Healt Association, 1995.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). D422-63. **Standard test method for particle-size analysis of soils. In Annual book of ASTM Standards**. Vol. 04.08. West Conshohocken (PA): American Society for Testing and Materials. 2003, p. 10-17.

ECOLOGICAL SERVICES FRO PLANNING (ESP). **Aquatic effects technology evaluation, 1996 field evalution**. Final survey report for Dome Mina, Ottawa (ON): Prepared for Aquatic Effects Technology Evaluation Program, Natural Resources Canada, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). **Test methods for evaluating solid waste – physical and chemical methods, sw – 846**. Washington (DC): United States Environmental Protection Agency, 1986.

WENTWORTH, C.K. A scale of grade and classa terms for clastic sediments. **The Journal of Geology**, 1992, v. 30, p. 377-392.

9 Avaliação dos dados e interpretação

ALLDREDGE, J.R. Sample size for monitoring of toxic chemical sites. **Environmental Monitoring and Assessment**, 1987, v. 9, p. 143-154.

ARCISZEWSKI, T.J.; MUNKITTRICK, K.R. Development of an adaptive monitoring framework for long-term programs: an example using indicators of fish health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 2015.

BAILEY, R.C.; NORRIS, R.H.; REYNOLDSON, T.B. Bioassessment of freshwater ecosystems: using the reference condition approach. Boston (MA): **Kluwer Academic Publishers**, 2003.

BARRETT, T.J.; HILLE, K.A.; SHARPE, R.L. Quantifying Natural Variability as a Method to Detect Environmental Change: Definitions of the Normal Range for a Single Observation and the Mean of M Observations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2015, v. 34, n. 5, p. 1185-1195.

BARRETT, T.J. *et al.* Dealing with heterogeneous regression slopes in analysis of covariance: new methodology applied to environmental effects monitoring fish survey data. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2010, v. 166, p. 279-291.

BURD, B.J.; NEMEC, A.; BRINKHURST, R.O. The development and application of analytical methods in benthic marine infaunal studies. **Advances in Marine Biology**, 1990, v. 26, p. 169-247.

CHAMPELY, S. *et al.* **Basic Functions for Power Analysis – Package 'pwr'**, 2015, v. 1, p. 1-3.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. 2nd ed. Hillsdale (NJ): Lawrence Erlbaum Associates, 1988.

CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015.

DAY, R.W.; QUINN, G.P. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. **Ecological Monographs**, 1989, v. 59, p. 433-463.

ENVIRONMENT CANADA. **Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document**. 2010, p. 481.

_____. **Lower Athabasca Water Quality Monitoring Plan**. Phase 1. Environment Canada, Gatineau, QC. 2011, p. 81.

_____. **Metal Mining Technical Guidance for Environmental Monitoring**. 2012, p. 550.

FAIRWEATHER, P.G. Statistical power and design requirements for environmental monitoring. Aust. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research's**, 1991, v. 42, p. 555-567.

FOX, D.R. Environmental power analysis – a new perspective. **Environmetrics**, 2001, v. 12, p. 437-449.

GREEN, R.H. Sampling design and statistical methods for environmental biologists. New York (NY): **Wiley-Interscience**, 1979.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**. 1969, v. 11, p. 1-21.

HEWITT, L.M. *et al.* A Proposed Framework for Investigation of Cause for Environmental Effects Monitoring. Human and Ecological Risk Assessment: **An International Journal**, 2003, v. 9, p. 195–211.

HUITEMA, B.E. **The analysis of covariance and alternatives**. New York (NY): John Wiley & Sons, Inc, 1980.

KEIZER-VLEK, H.E. *et al.* Quantifying spatial and temporal variability of macroinvertebrate metrics. **Ecological Indicators**, 2012, v. 23, p. 384-393.

KEOUGH, M.J.; MAPSTONE, B.D. **Protocols for designing marine ecological monitoring associated with BEK mills. (Technical Report Series 11). National Pulp Mills Research Program**. Canberra (AU): Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, 1995.

KILGOUR, B.W.; SOMERS, K.M.; MATTHEWS, D.E. Using the normal range as a criterion for ecological significance in environmental monitoring and assessment. **Ecoscience**. 1998, v. 5, n. 4, p. 542-550.

KRAEMER, H.C. THIEMANN, S. **How many subjects? Sage Publications.** Newbuty Park, 1987.

KREBS, C.J. **Ecological Methodology**. Addison Wesley, Menlo Park, 1998, p. 620, 1998.

MILLER, R.G. **Beyond ANOVA:** Basics of applied statistics. New York (NY): John Wiley & Sons, Inc, 1986.

MUDGE, J.; *et al.* Negative consequences of using $\alpha = 0.05$ for environmental monitoring decisions: A case study from a decade of Canada's Environmental Effects Monitoring program. **Environmental Science & Technology**, 2012, v. 46, p. 9249-9255.

MULLER, K.E.; BENIGNUS, V.A. Increasing Scientific Power with Statistical Power. **Neurotoxicology and Teratology**, 1992, v. 14, p. 211-219.

MUNKITTRICK, K.R. *et al.* A review of potential methods of determining critical effect size for designing environmental monitoring programs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2009, v. 8, n. 7, p. 1361-1371.

OSENBERG, C.W. *et al.* Detection of environmental impacts: natural variability, effect size and power analysis. In: **Ecological Applications**, 1994, v. 4, p. 16-30.

REED, J.M.; BLAUSTEIN, A.R. Biologically significant population declines and statistical power. **Conservation Biology**, 1997, v. 11, p. 281-282.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3rd ed. New York (NY): W.H. Freeman, 1995.

THOMAS, L.; FRANCIS, J.; The importance of statistical power analysis: an example from **Animal Behaviour.** Animal Behaviour, 1996, v. 52, p. 856-859.

WAGNER, T. *et al.* Detecting Temporal Trends in Freshwater Fisheries Surveys: Statistical Power and the Important Linkages between Management Questions and Monitoring Objectives. **Fisheries**, 2013, v. 38, p. 309-319.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 5th Edition. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 2010, p. 944.

OS PARCEIROS

A APLYSIA é uma empresa especializada na prestação de serviços inovadores de avaliação ambiental, que desenvolve e implementa projetos apoiados em metodologias de aceitação nacional e internacional.
Todos os serviços realizados pela APLYSIA têm atestados de capacitação que certificam sua qualidade e o grau de satisfação dos clientes. Além disso, os trabalhos realizados são constantemente submetidos à comunidade científica, o que contribui para a pesquisa de questões ambientais em todo o mundo. A empresa também participa anualmente de congressos específicos nos EUA, Canadá e Europa, com apresentação de trabalhos técnicos.

A ArcelorMittal Tubarão é uma unidade de produção integrada de aços planos, localizada na Região Metropolitana da Grande Vitória, no Espírito Santo, no Sudeste do Brasil. Com capacidade de produção anual de 7,5 milhões de toneladas de aço em placas e bobinas a quente, emprega diretamente mais de 4,5 mil pessoas. Com uma cultura corporativa focada no compromisso com o desenvolvimento sustentável, é uma das líderes entre os fornecedores de aço de alta qualidade e ocupa posição de vanguarda em Gestão Ambiental e Relações Institucionais com os diferentes públicos.

O Instituto Canadense de Rios, fundado em 2000 a partir da colaboração de pesquisadores da Universidade de Brunswick tem por missão desenvolver ciência aquática necessária para entender, proteger e manter os recursos hídricos regionais, nacionais e do planeta. Reúne pesquisadores, no Canadá e em outros países, com interesses comuns na ciência aquática, através de universidades, governos e indústrias. O CRI utiliza da abordagem multidisciplinar e intersetorial focando suas pesquisas nas demandas da sociedade por recursos hídricos. O seu inovador modelo combina o conhecimento acadêmico, ciência básica e aplicada, promovendo a rápida transferência do novo conhecimento para as agências reguladoras contribuindo para a criação de efetivas políticas públicas de melhoria da sociedade e da respectiva qualidade de vida, no país e fora dele.

Comitê de bacia hidrográfica é o fórum de decisão no âmbito de cada bacia hidrográfica contando com a participação dos usuários, das prefeituras, da sociedade civil organizada, das demais esferas do governo estadual, destinado a agir como o "parlamento das águas da bacia". A principal competência do comitê é aprovar o Plano Estadual de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica, instrumento da Política Estadual de Recursos Hídricos cuja prerrogativa legal é exclusiva do comitê.
Os comitês em que o Projeto Peixe Guia foi desenvolvido são: CBH Rio Jucu, rio este que abastece a Região Metropolitana de Vitória, a capital do Estado; e CBH Rio Benevente, na região sul do Estado e que abrange os municípios de Alfredo Chaves, Anchieta, Guarapari, Piúma e Iconha.
O Rio Benevente nasce no município de Alfredo Chaves, na Serra do Tamanco, no Distrito de São Bento de Urânia. O rio percorre cerca de 79 Km e tem sua foz no município de Anchieta, onde forma um manguezal ainda bem preservado que fomenta uma grande produção pesqueira

na região. Seus principais afluentes são os rios Batatal, Caco do Pote, Corindiba, Conceição, Crubixá, Grande, Iriritimirim, Joeba, Maravilha, Pongal, Salinas e São Joaquim. Sua vazão média é de 25.104,5 l/s. As principais atividades econômicas da Região do Rio Benevente são a pecuária e monoculturas como banana, café e olerícolas. Também são características da região as atividades relacionadas ao turismo e a pesca. Predominam a pequena e a média propriedades.
O Rio Jucu apresenta suas nascentes situadas na região serrana do estado, em altitudes até 1.800 m acima do nível médio do mar, e sua foz localiza-se no Balneário da Barra do Jucu no município de Vila Velha no Espírito Santo, junto ao Oceano Atlântico. Na região serrana o Jucu apresenta dois braços: o braço sul, mais curto, e o braço norte, mais extenso. A sua bacia compreende os municípios de Domingos Martins, Marechal Floriano, Viana, Vila Velha e parte dos municípios de Cariacica e Guarapari. Os terrenos da bacia utilizados, principalmente, para os cultivos de café, legumes e hortaliças (olericultura), para o desenvolvimento de atividades ligadas ao turismo, para a proteção e conservação dos recursos naturais em Unidades de Conservação e no desenvolvimento e expansão de aglomerados urbanos.

CESAN

A Cesan é uma empresa de economia mista. O trabalho da empresa consiste na captação, no tratamento e na distribuição de água e na coleta e no tratamento de esgoto. Suas atividades compreendem ainda a realização de estudos, projetos e execução de obras relativas a novas instalações e ampliação de redes. A Cesan está presente em 52 dos 78 municípios do Espírito Santo, sendo sete na Região Metropolitana da Grande Vitória e 45 no interior. O principal objetivo da Cesan é melhorar a qualidade de vida da população do Espírito Santo.

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico é a agência do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil, e tem como atribuições fomentar a pesquisa científica e tecnológica e incentivar a formação de pesquisadores brasileiros. Criado em 1951, desempenha papel primordial na formulação e condução das políticas de ciência, tecnologia e inovação. Sua atuação contribui para o desenvolvimento nacional brasileiro e o reconhecimento das instituições de pesquisa e dos pesquisadores brasileiros pela comunidade internacional, além de contribuir para o avanço das fronteiras do conhecimento, o desenvolvimento sustentável e a soberania nacional.

Colônia de pescadores de Anchieta

Colônia de Pescadores de Anchieta surgiu em 1980, com a organização dos pescadores da região na Associação de Pescadores de Anchieta em 1999. Sua atividade pesqueira se desenvolve mais especificamente na Praia do Porto Velho, ou Coroa de Anchieta como também é conhecida. A sua atividade econômica de comercialização está associada também a marisqueiras e catadores de caranguejo. O destaque da atividade se deve à pesca de dourado e de camarão.

Colônia de pescadores de Vitória

São muitos os pontos em que residem comunidades pesqueiras da Baía de Vitória, mas poucos são os organizados. Os grupos que estão organizados caracterizam-se na Colônia de Pescadores Z5 ou Maria Ortiz, destacando os da Praia do Suá, Praia do Canto e Ilha das Caieiras. Associados ou com forte relação com a comunidade pesqueira estão as mulheres desfiadeiras de siri e os catadores de caranguejo.
A atividade da pesca na Ilha de Vitória ajuda a formar a identidade cultural dos capixabas, destacando neste contexto a moqueca, principal prato da culinária local, e as panelas de barro, produzidas pelas paneleiras.

Environment Canada

Agência ambiental federal canadense (Environment Canada) coordena as políticas e programas ambientais para o governo federal do Canadá, através da ciência credível, elaboração de efetivas regulações e leis, realização de parcerias de sucesso e serviços de alta qualidade para os canadenses. Colabora com seus parceiros no país e no estrangeiro para realizar iniciativas de proteção da saúde dos povos e do planeta.
Os programas da Environment Canada são organizados em quatro grandes linhas: ajudar os canadenses a se adaptarem ao seu meio-ambiente; reduzir o impacto da poluição; conservação da diversidade biológica; e apoio ao desenvolvimento sustentável.

GSA
GRÁFICA E EDITORA

Considerada uma das 10 melhores gráficas do Brasil, é capixaba com atividade há 46 anos. A GSA faz parte de uma Cadeia de Custódia, onde a garantia de que o papel vem de florestas com manejo responsável é evidenciada pelo certificado FSC. Seus constantes investimentos asseguram o que o mundo gráfico oferece de melhor. Ainda, a GSA busca a melhoria contínua de seus processos através de um sistema de gestão da qualidade certificado pelas normas ISO, aliado a profissionais qualificados, alta tecnologia e agilidade no atendimento.

iema
INSTITUTO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

O Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos (Iema), criado em 2002, é uma entidade autárquica vinculada à Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (Seama), com autonomia técnica, financeira e administrativa e tem por finalidade planejar, coordenar, executar, fiscalizar e controlar as atividades de meio ambiente, dos recursos hídricos estaduais e dos recursos naturais federais, cuja gestão tenha sido delegada pela União. A Seama é um órgão da administração direta, gestora da política do Meio Ambiente. Foi criada em 1987 para orientar as ações da sociedade para o uso sustentável dos recursos naturais e a melhoria da qualidade de vida. Tem como finalidade, gerenciar as políticas estaduais de Meio Ambiente e de Recursos Hídricos

INSTITUTO APLYSIA

O Instituto APLYSIA é uma organização sem fins lucrativos cuja missão é promover e realizar pesquisas particularizadas e inovadoras que contribuam para o controle ambiental e conservação da natureza, aliado às ações sociais visando a sustentabilidade, em parceria com entidades públicas, a iniciativa privada e com a sociedade civil organizada.

INSTITUTO FEDERAL
Espírito Santo

O Instituto Federal do Espírito Santo foi constituído em 2008 a partir da Lei nº 11.892, que criou em todo o Brasil 38 institutos federais de educação, ciência e tecnologia. No Espírito Santo, o Cefetes e as Escolas Agrotécnicas de Alegre, de Colatina e de Santa Teresa se integraram em uma estrutura única: o Instituto Federal do Espírito Santo. A oferta de cursos técnicos e de graduação é realizada de acordo com a vocação da região onde cada campus está inserido e com os arranjos produtivos locais.
O Ifes oferece cursos superiores de licenciatura, bacharelado e tecnólogo nas modalidades presencial e a distância.

INSTITUTO TERRA

O Instituto Terra é fruto da iniciativa do casal Sebastião Salgado e Lélia Wanick que, há pouco mais de uma década, diante de um cenário de degradação ambiental em que se encontrava a antiga fazenda de gado adquirida da família de Sebastião Salgado, na cidade mineira de Aimorés, tomou uma decisão: devolver à natureza o que décadas de degradação ambiental destruiu. Sebastião e Lélia mobilizaram parceiros, captaram recursos e fundaram, em 1998 a organização ambiental, de caráter civil sem fins lucrativos, dedicada ao desenvolvimento sustentável do Vale do Rio Doce, o Instituto Terra, que atua nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Esta região vivencia as consequências do desmatamento e do uso descontrolado dos recursos naturais como a seca, a erosão do solo e a falta de condições para o homem do campo viver e prosperar. As principais ações do Instituto Terra envolvem a restauração ecossistêmica, produção de mudas de Mata Atlântica, extensão ambiental, educação ambiental e pesquisa científica aplicada.

ESPÍRITO SANTO EM AÇÃO

O compromisso de atuar na formação de uma sociedade melhor e mais justa foi o objetivo de um grupo de empresários ao se reunir e fundar, em 2003, o Espírito Santo em Ação, ONG que visa tornar as empresas ainda mais conscientes e participativas em seu papel econômico e social.
O Espírito Santo em Ação mantém seu compromisso de colaborar para a melhoria contínua do Estado, promovendo a elaboração do Plano de Desenvolvimento Espírito Santo 2025 (primeira versão) e o Plano Estratégico de Desenvolvimento do Espírito Santo 2030.

SAMARCO

Fundada em 1977, a Samarco é uma empresa brasileira de mineração, de capital fechado, controlada em partes iguais por dois acionistas: BHP Billiton Brasil Ltda. e Vale S/A. Seu principal produto, pelotas de minério de ferro, são produzidas a partir da transformação de minerais de baixo teor em um produto nobre, de alto valor agregado, e comercializado para a indústria siderúrgica mundial. A Samarco acredita e pratica a mineração responsável, com elevada participação no desenvolvimento das comunidades vizinhas, garantindo que o seu desenvolvimento se reflita também nas regiões onde atua e com os públicos com os quais se relaciona.

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
Secretaria da Ciência, Tecnologia, Inovação, Educação Profissional e Trabalho

A Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia, Inovação, Educação Profissional e Trabalho do Espírito Santo (Secttti) foi criada com o objetivo de implementar a Política Estadual de Ciência e Tecnologia e coordenar o Sistema Estadual de Ciência e Tecnologia. Tem como atribuições o planejamento, a coordenação e a avaliação da Política Estadual de Ciência e Tecnologia e a coordenação do respectivo sistema, destacando-se: a identificação de fontes de financiamentos nacionais e internacionais, de caráter público ou privado, para o desenvolvimento de projetos e atividades nas áreas de ciência, tecnologia e inovação; a articulação com instituições públicas e privadas, nacionais e estrangeiras, visando o desenvolvimento de suas atividades e o estabelecimento de base de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico, mediante formalização de contratos, parcerias, convênios ou ajustes; o estímulo à realização de estudos e pesquisas de interesse estratégico para o Espírito Santo, bem como o fomento ao desenvolvimento de ciência, tecnologia e inovações.

PREFEITURA DE VILA VELHA

Na Gestão do Meio Ambiente de Vila Velha, a Secretaria Municipal de Desenvolvimento Sustentável de Vila Velha é responsável, dentre outras, pela formulação e execução de políticas e planos para a defesa e preservação do meio ambiente; pela promoção de pesquisas, estudos e diagnósticos visando a subsidiar as políticas e planos de meio ambiente; pelo licenciamento ambiental de atividades potencialmente poluidoras e consumidoras de recursos naturais; pela criação e administração de áreas de conservação ambiental e gestão de recursos hídricos e ecossistemas; e pela promoção da educação e conscientização ambientais.
Em Vila Velha nasceu o Espírito Santo. A colonização do solo espírito-santense começou em 23 de maio de 1535. Com seus 478 anos, a cidade tem muito para contar com sua história e arquitetura secular. Vila Velha possui 32 quilômetros de litoral. A cidade é famosa por suas belezas naturais e praias limpas. Um dos monumentos mais imponentes é o Convento da Penha, que fica num penhasco de 154 metros de altitude. Com um clima ameno e boas condições marítimas, Vila Velha tem muito a oferecer para a prática do turismo náutico, religioso, ecoturismo e agroturismo. Uma das comemorações de destaque nacional é a Festa da Penha, terceiro maior evento religioso católico do país, que insere o município no cenário nacional do turismo religioso.

PREFEITURA DE GUARAPARI

A Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Guarapari (Sema) é o órgão de coordenação, controle e execução da política de meio ambiente desse município.
Principal cidade turística do Espírito Santo, Guarapari atrai diversos turistas do mundo inteiro graças às suas belezas naturais. Tradição, história e cultura se fundem para ter no turismo o registro no tempo e ficar como legado para as demais gerações. Privilegiada não só pela natureza que a dotou de muitos encantos, cantada em prosa e verso como maravilha da natureza, Guarapari teve a sorte de ter abrigado, durante o período colonial, uma das figuras mais expressivas da Igreja e da própria História do Brasil, o Santo (Padre) José de Anchieta. Queria ele que os padres amassem seus índios, apoiassem a catequese, a civilização e a liberdade dos mesmos.

PREFEITURA DE ANCHIETA

A Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Anchieta (Seman) é o órgão de coordenação, controle e execução da política de meio ambiente desse município.
Anchieta se originou de uma aldeia de índios catequizada pelos padres jesuítas. O nome Anchieta é uma homenagem a José de Anchieta, padre jesuíta espanhol. Com uma riquíssima herança histórica, além

de privilegiado por 23 belas praias, lagoas, falésias e rios adornados por um riquíssimo manguezal, o município de Anchieta tem todos os atributos necessários para um desenvolvimento ainda maior no segmento do turismo. Uma parte da economia de Anchieta está baseada na agricultura familiar. Entre as principais culturas destacam-se a banana, a mandioca, o milho, o arroz, o café e o feijão. A pesca também ajuda a movimentar a economia da cidade. Essa atividade é realizada no litoral do município ou em alto mar, na região de Abrolhos. A maior receita do município vem das empresas situadas na região. A Samarco Mineração S/A é responsável pelo maior repasse, que de forma direta é proveniente do Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços (ICMS). E de forma indireta está a arrecadação através das empresas terceirizadas, por meio do Imposto sobre o Serviço de Qualquer Natureza (ISSQN).

PREFEITURA DE VITÓRIA

São atribuições da Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Vitória cadastrar, licenciar, monitorar e fiscalizar condutas, processos e obras que causem ou que possam degradar a qualidade ambiental; estimular e realizar o desenvolvimento de estudos e pesquisas de caráter científico, tecnológico, cultural e educativo, objetivando a produção de conhecimento e a difusão de uma consciência de preservação ambiental.
A fundação do Espírito Santo e de Vitória começa 34 anos depois de o Brasil ter sido descoberta em 1500. Nos 300 anos iniciais de sua história, Vitória foi uma vila-porto, tendo enfrentado franceses e ingleses atrás de açúcar e de pau-brasil. É uma das três capitais mais antigas do Brasil, atrás apenas de Recife e Salvador. A partir de meados do século XX, a cidade se transformou em função das mudanças econômicas ocorridas no Estado. A ocupação urbana se estendeu por grande parte da ilha e avançou, definitivamente, em direção à porção continental do município. Circundado pela Baía de Vitória e pelo estuário formado pelos rios Santa Maria, Marinho, Bubu e Aribiri, o município apresenta ilhas, encostas, enseadas, mangues e praias, elementos de grande recurso paisagístico.

SEBRAE
Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

O Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (Sebrae) é uma instituição sem fins lucrativos que tem como missão promover a competitividade e o desenvolvimento sustentável das micro e pequenas empresas e fomentar o empreendedorismo. No Espírito Santo, o Sebrae vem, há 40 anos, contribuindo para o aperfeiçoamento técnico de microempresas, empresas de pequeno porte e empreendedores individuais capixabas. O Sebrae está presente em todas as regiões do estado, com sua estrutura própria e a de parceiros, promovendo e apoiando ações voltadas à consolidação de um modelo de desenvolvimento sustentável, baseado na facilitação do acesso ao conhecimento, crédito, tecnologia e mercado.

ÚLTIMOS REFÚGIOS

O Instituto Últimos Refúgios é uma instituição sem fins lucrativos, que visa à sensibilização ambiental através de imagens. O Instituto Últimos Refúgios tem como objetivo sensibilizar a sociedade sobre a existência e consequente necessidade de preservação das áreas preservadas do país. Para isso, desenvolve projetos fotográficos e vídeos documentais, e trabalha na divulgação de ambos, com o intuito de disponibilizar um registro uníssono desses refúgios ambientais e promover a sensibilização sobre a existência dos mesmos e enfatizar a necessidade de efetivos esforços para a sua conservação. Seu objetivo é chamar a atenção da sociedade para os problemas causados e causadores da atual crise da biodiversidade.

UNB Saint John

Reconhecida como uma universidade multicultural, a Universidade de New Brunswick tem uma longa história de colaboração com parceiros internacionais acolhendo estudantes de todo o mundo, bem como iniciativas de pesquisa com um foco internacional. Tem na sua missão prover uma excelente e transformadora educação para seus estudantes, encorajando iniciativas e inovação, desbloqueando o seu potencial criativo. Está comprometida a entender e solucionar os problemas atuais e futuros, servindo a comunidade e pelo engajamento dos seus alunos, egressos e parceiros ao redor do mundo.

A Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) é uma instituição autárquica vinculada ao Ministério da Educação (MEC), com autonomia didático-científica, administrativa e de gestão financeira e patrimonial, e que atua com base no princípio da indissociabilidade entre o ensino, a pesquisa e a extensão, com vocação para atuar em todas as áreas do saber. A Ufes também presta diversos serviços ao público acadêmico e à comunidade, como teatro, sala de cinema, galerias de arte, centro de ensino de idiomas, bibliotecas, planetário e observatório astronômico, auditórios, ginásio de esportes e outras instalações esportivas. Oferece também serviços na área de saúde por meio do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes (Hucam).

UNIVERSIDADE VILA VELHA
ESPÍRITO SANTO

Oferecendo 38 cursos superiores, sendo 31 de Graduação e sete de Graduação Tecnológica, além da variedade e qualidade dos cursos de Pós-Graduação Latu Sensu e dos programas de Mestrado e Doutorado, a missão da Universidade de Vila Velha é produzir, oferecer e difundir conhecimentos para a formação de profissionais empreendedores, comprometidos com a inovação, sensíveis às causas sociais, culturais, políticas e econômicas, com uma visão contextualizada e globalizada.

VALE

Com a missão de transformar recursos naturais em prosperidade e desenvolvimento sustentável, a Vale é uma mineradora global, com sede no Brasil, líder na produção de minério de ferro e a maior produtora de níquel. Busca garantir a conservação da água por meio de iniciativas que vão além do atendimento aos requisitos legais, atuando em diferentes instâncias: do desenvolvimento de tecnologias inovadoras à participação na construção de instrumentos legais de gestão de recursos hídricos. Promove e incentiva pesquisas e desenvolvimento de tecnologias com temas complementares ao Desenvolvimento Sustentável e à Mineração.

INSTITUTO APLYSIA

Diretora Presidente
Tatiana Heid Furley
Diretor Administrador/Financeiro
Carlos Magno Libardi da Penha
Diretora Técnica
Heloisa Giacomin Ohnishi
Diretor de Relações Institucionais
Robson de Almeida Melo e Silva
Conselho Fiscal
Kátia Regina Chagas
Fernando Aquinoga de Mello
Sigrid Heid Furley

PROJETO PEIXE GUIA

Realização
Instituto APLYSIA

Equipe

Coordenação Geral
Tatiana Heid Furley
Relações Institucionais
Clayton Perônico – Diretor de Relações Empresariais e Extensão Comunitária do IFES
Robson Melo – Diretor de Relações Institucionais do Instituto APLYSIA
Gerência de Projeto
Joselaine Broetto Lombardi Siqueira
Coordenação Operacional
Marcelo Paes Gomes – Instituto Federal do Espírito Santo
Priscylla da Mata Pavione – Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq
Juarez Coelho Barroso – Instituto Federal do Espirito Santo
Jones Santander Neto – Instituto Federal do Espirito Santo
Thiago Holanda Basílio – Instituto Federal do Espirito Santo
Orientadores
Mark Ervin McMaster – Environment Canada
Joanne Louise Parrott – Environment Canada
Kelly Roland Leslie Herbert Munkittrick – University of New Brunswick – Canada
Larry Mark Hewitt – Environment Canada

Equipe Técnica

APLYSIA Soluções Ambientais
Karina de Oliveira Mendes
Marcos Barreto Ramos
Instituto Federal do Espirito Santo – Campus Piúma
Jacques Douglas Coimbra Dias
Lucas Comasseto
Victor Hugo Silva e Silva
Secretária Municipal de Meio Ambiente de Vitória
Flávio Nascimento Coelho
Universidade Federal de Minas Gerais
Fabio Vieira
Universidade Federal do Espirito Santo
Antônio Sergio de Mendonça
Francisco Candido Cardoso Barreto
Gilberto Fonseca Barroso
João Luiz Gasparini
Karla Gonçalves da Costa
Marco César Cunegundes Guimarães
Mércia Barcellos da Costa
Universidade Vila Velha
Adriana Regina Chippari Gomes

Apoio de Campo

APLYSIA Soluções Ambientais
Guilherme Henrique Peterlini Tavares
Rodolfo Pessotti Messner Campelo
Instituto Federal do Espirito Santo – Campos Piúma
Luciano Pinto de Almeida
Marcelly de Almeida Teixeira
Tharllei Moutinho Camargos
Silvio Cesar Costa
Marinha do Brasil – Capitania dos Portos do Espírito Santo
Pescadores
Charles André Rosa
Claudio Rodrigues
Ronaldo Barbosa
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Vitória
Amanda Nogueira de Oliveira
Andressa Guimarães de Oliveira
Enilda Baldan Pereira
Luciano Assis Oliveira
Paulo Rodrigues Pinheiro
Peterson Jesus Martins
Secretaria Municipal de Pesca e Aquicultura de Anchieta
Richardson Quinteiro
Rui Luiz
Sebastião Vicente de Oliveira
Joaquim da Purificação Flores
Universidade Vila Velha
Vinicius Davel Castheloge

Apoio de Laboratório

APLYSIA Soluções Ambientais
Ananda Giacomin Furieri
ArcelorMittal Tubarão
Erick Gomes Lopes
Josiane Araujo Martins
Rubiana Taquete Brandão
Instituto APLYSIA
Tamires Cruz dos Santos
Instituto Federal do Espirito Santo – Campos Piúma
Anna Ligia Somolinos
Grace Real Hohn
Ludmila Ribeiro Peloso
Marcella Maria Nunes Gualter
Maysa Macedo Ribeiro
Natalia Carriço Paulo
Rosali Barboza Cavaline
Wander Lúcio da Luz
Universidade Federal do Espirito Santo
Dillyane Brito
Felipe Souza Cordeiro
Gabriel Mauri
Gean Zanetti
Gisele Oliveira Tonácio
Guilherme Cadetti
Layanne Wingler
Lilian Marin
Mônica Pereira de Jesus
Eliezer Alves Evangelista Junior
Emanuely Ezidio da Silva
Thassyane Rios
Wanderson Juvencio Keijok
Universidade Vila Velha
Alexandra Caroline da Silva Veronez
Alexandra Frossard
Amanda Daleprani Duarte
Emanuelle Carneiro
Frederico Dellunardo
Leticia Coutinho Sangy Dias
Rômulo Victo Salla
Vinicius Dadalto Baroni

Apoio de tradução e revisão

APLYSIA Soluções Ambientais
Bruno Ferreira da Silva
Carolina Fernandes Pinto
Janaina Uchôa Medeiros Agra
Reinaldo Baldotto Ribeiro Filho
Ricardo Wagner Reis Filho
Thiago Freitas Soares
Instituto Federal do Espirito Santo – Campos Piúma
Fernando Espósito

Apoio gerencial de parceiros

ArcelorMittal Tubarão
Fernanda Passamani
João Bosco Reis da Silva
José Aparecido de Lima
Companhia Espirito Santense de Saneamento
Maria Helena Alves
Samarco Mineração S.A.
Sandrelly Amigo Lopes
Sebrae
Célia Perin
Mário Barradas
Secretaria Municipal de Desenvolvimento Sustentável de Vila Velha
Maria Candida Ramos Donatelli
Rodrigo Cesar Mathias Cardoso
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Anchieta
Igor de Oliveira Medeiros
Ithon Ramos
Jéssica Nogueira Goulart
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Vitória
Marcia Soares Gomes de Oliveira
Priscila Ligia Viana Alvarino
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Guarapari
Jéssica Martins de Freitas
Secretária Municipal de Pesca e Aquicultura de Anchieta
André Ricardo Doelinger Santiago
Fernando Cavalcanti de Sales Junior
Soraya Doellinger Assad
Vale S.A.
Austregésilo Guimarães

Apoio Institucional

APLYSIA Soluções Ambientais
Carlos Magno Libardi da Penha
ArcelorMittal Tubarão
Guilherme Corrêa Abreu
Comitê de Bacia Hidrográfica do Jucu
Elio de Castro Paulino
Comitê de Bacio Hidrográfica do Benevente
Sinval Rosa da Silva
Companhia Espirito Santense de Saneamento
Anselmo Tozi
Denise Cadete
Neivaldo Bragato
Comunidade de Pescadores, Colônia Z4 Marcilio Dias
José Luiz Carvalho Doelinger
Espirito em Ação
Orlando Caliman
GSA – Gráfica & Editora
Conrado Vieira
IEMA
Sueli Passoni Tonini
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espirito Santo
Dênio Rebello Arantes
Tadeu Sant'Anna Pissinati
Instituto Terra
Adonai LaCruz
Jean-Pierre Tavares Salgado

Samarco Mineração S.A.
Marco Isaias Perdigão Mendes
Rodolpho Samorini Filho
Secretaria Municipal de Desenvolvimento Sustentável de Vila Velha
Jader Mutzig
Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia, Inovação, Educação Profissional e Trabalho do Espírito Santo
Lucio Fernando Spelta
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Guarapari
Afonso Rodrigues Pereira Filho
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Anchieta
Marcelo Lopes Dalbom
Naelson Lima Almeida
Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Vitória
Cleber Bueno Guerra
Paulo Barbosa
Serviço de Apoio ás Micro e Pequenas Empresas
José Eugênio Vieira
Benildo Denadai
Ruy Dias
Universidade Federal do Espirito Santo
Antônio Sergio Mendonça
Universidade Vila Velha
Manoel Ceciliano Salles de Almeida
Vale S.A.
Eugênio Fonseca
Fotografia
Leonardo Merçon – Instituto Últimos Refúgios
Joarley Rodrigues
Priscylla Pavione
Comunicação
Viva Comunicação
Controle Jurídico
Pepe de Morais – Advocacia
Controle contábil
Nacif Serviços Contábeis ss Ltda.

Este livro foi impresso pela *Gráfica GSA* na primavera de 2015, em Vitória – ES, com miolo em papel Offset 90 g/m² e composto com as tipografias *Aktiv Grotesk* e *Kings Caslon*, ambas da DaltonMaag.

ISBN 9788556420008