

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

PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM EM CAMPO

Coordenação Geral

Adalto Bianchini

Alex Cardoso Bastos

Edmilson Costa Teixeira

Eustáquio Vinícius de Castro

Jorge Abdala Dergam dos Santos

Vitória,

Novembro de 2019

COORDENAÇÃO POR ANEXO

Anexo 1

Adalto Bianchini (FURG)

Anexo 3

Edmilson Costa Teixeira (UFES)

Fabian Sá (UFES)

Jorge Dergam (UFV)

Subprojetos

Alessandra Delazari Barroso (FAESA)

Alex Cardoso Bastos (UFES)

Ana Cristina Teixeira Bonecker (UFRJ)

Anderson Geyson Alves de Araújo (UFES)

Björn Gücker (UFSJ)

Camilo Dias Júnior (UFES)

Daniel Rigo (UFES)

Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna (UFOP)

Gilberto Amado Filho (IPJB)

Gilberto Fonseca Barroso (UFES)

Iola Gonçalves Boechat (UFSJ)

Leila Lourdes Longo (UFRB)

Leonardo Tavares Salgado (IPJB)

Luís Fernando Loureiro (UFES)

Marco Aurélio Caiado (UFES)

Renato David Ghisolfi (UFES)

Renato Rodrigues Neto (UFES)

Rodrigo Leão de Moura (UFRJ)

Valéria da Silva Quaresma (UFES)

Valéria de Oliveira Fernandes (UFES)

Vânia Marcia Duarte Pasa (UFMG)

Anexo 4

Jacqueline Albino (UFES)

Subprojetos

Karla Costa (UFES)

Maria Tereza Carneiro (UFES)

Anexo 5

Diolina Moura Silva (UFES)

Mônica Tognella (UFES)

Anexo 6

Agnaldo Silva Martins (UFES)

Subprojetos

Ana Paula Cazerta Farro (UFES)

Leandro Bugoni (FURG)

Sarah Vargas (UFES)

Anexo 7

Maurício Hostim (UFES)

Jorge Dergam (UFV)

Subprojetos

Carlos W. Hackradt (UFSB)

Fabiana Felix Hackradt (UFSB)

Jean-Christophe Joyeux (UFES)

Luis Fernando Duboc (UFV)

Anexo 8

Heitor Evangelista (UERJ)

Coordenação Técnica (CTEC)

Alex Cardoso Bastos

Lara Gabriela Magioni Santos

Laura Silveira Vieira Salles

Tarcila Franco Menandro

Coordenação Escritório de Projetos

Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro

Patrícia Bourguignon Soares

Paulo Roberto Filgueiras

Valdemar Lacerda Junior

Walter Luiz Alda Junior

Coordenação Núcleo de Atuação Integrada em Rede (NAIR)

Edmilson Costa Teixeira

Karla Libardi Gallina

Andressa Christiane Pereira

Anna Paula Lage Ribeiro

Caroline De Marchi Pignaton

Paulo Eduardo Marques

Contato

Rede Rio Doce Mar - RRDM

Escritórios de Projetos

Universidade Federal do Espírito Santo

Av. Fernando Ferrari, 514

Goiabeiras, Vitória, ES, CEP 29075-910

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 14 |
| 2 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA SEGURANÇA EMBARCADA | 15 |
| 2.1 ATRIBUIÇÕES TÉCNICAS DE EMBARQUE E PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA | 15 |
| 2.2 RELATÓRIO DE EMBARQUE | 16 |
| 2.3 COMUNICAÇÃO | 16 |
| 3 PROCEDIMENTOS PARA GARANTIA DA QUALIDADE DA AMOSTRAGEM | 17 |
| 4 Coleta, armazenamento, transporte e recebimento de amostras | 17 |
| 5 PROCEDIMENTOS PARA AMOSTRAGEM EM CAMPO | 19 |
| 5.1 ANEXO 1. MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO DOS IMPACTOS CAUSADOS PELA LAMA ORIUNDA DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE MARIANA (MG) EM REGIÕES DULCÍCOLAS, ESTUARINAS E MARINHAS | 19 |
| 5.1.1 Matriz coluna d'água | 23 |
| ❖ Coletas para determinações físico-químicas | 23 |
| ❖ Metais e composição iônica | 23 |
| ❖ Metais, íons e carbono orgânico dissolvido (COD) | 23 |
| 5.1.2 Matriz sedimento superficial | 24 |
| ❖ Metais | 24 |
| ❖ Triagem de organismos | 24 |
| 5.1.3 Matriz água e sedimento para os ensaios ecotoxicológicos | 25 |
| ❖ Considerações sobre coleta de água bruta e sedimento | 25 |
| ❖ Limpeza e preparo dos recipientes | 25 |
| ❖ Coleta de amostras | 26 |
| ❖ Equipamentos de amostragem | 27 |
| ❖ Procedimentos para coleta de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos em águas superficiais: | 27 |
| ❖ Procedimentos para coleta de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos em sedimento: | 27 |
| ❖ Preservação de amostras | 28 |
| ❖ Acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras | 28 |
| 5.1.4 Matriz água para análises microbiológicas | 29 |
| ❖ Coleta das amostras de água | 29 |
| ❖ Procedimentos de campo importantes para filtragem e estocagem | 30 |
| 5.1.5 Matriz sedimento para análises microbiológicas | 30 |
| ❖ Procedimentos importantes para coleta e estocagem | 30 |
| ❖ Coleta das amostras de sedimento | 31 |
| 5.1.6 Matriz biota (coral) para as análises microbiológicas | 31 |

| | |
|--|-----------|
| ❖ Procedimentos importantes para coleta e estocagem: | 31 |
| ❖ Coleta das amostras de corais | 31 |
| 5.1.7 Matriz biota para análises de contaminantes e biomarcadores..... | 31 |
| ❖ Fitoplâncton e Zooplâncton | 34 |
| ❖ Invertebrados bentônicos | 36 |
| ❖ Corais e hidrocorais..... | 36 |
| ❖ Crustáceos | 38 |
| ❖ Vertebrados | 41 |
| ❖ Girinos | 41 |
| ❖ Peixes..... | 41 |
| ❖ Aves..... | 46 |
| 5.2 ANEXO 3. MONITORAMENTO AMBIENTAL NO RIO DOCE, ÁREA ESTUARINA E MARINHA SISTEMA AQUÁTICO DULCÍCOLA | 47 |
| 5.2.1 Matriz coluna d'água..... | 51 |
| ❖ Vazão fluvial e Correntes..... | 51 |
| ❖ Material Particulado em Suspensão | 51 |
| ❖ Salinidade | 52 |
| ❖ Nível d'água..... | 52 |
| ❖ Parâmetros físico-químicos | 52 |
| ❖ Alcalinidade | 52 |
| ❖ Nutrientes | 52 |
| ❖ Hidrobiológicos (clorofila a e feopigmentos - pigmentos fotossintetizantes)..... | 53 |
| ❖ Compostos orgânicos | 53 |
| ❖ Metais | 54 |
| ❖ Elementar (particulado) | 54 |
| ❖ Isótopos (particulado) | 55 |
| 5.2.2 Matriz sedimento superficial..... | 56 |
| ❖ Aspectos físicos (Granulometria e Mineralogia) | 56 |
| ❖ Parâmetros físico-químicos (pH e Predox) | 56 |
| ❖ Matéria orgânica..... | 56 |
| ❖ Nutrientes (Orto-fosfato em água intersticial e Fósforo Total) | 57 |
| ❖ Metais | 57 |
| ❖ Compostos orgânicos | 57 |
| ❖ Elementar (particulado) | 58 |
| ❖ Isótopos (particulado) | 59 |
| 5.2.3 Matriz sedimento testemunho..... | 60 |
| 5.2.4 Matriz biota | 60 |
| ❖ Fitoplâncton | 60 |
| ❖ Zooplâncton | 62 |
| ❖ Macrófitas | 62 |
| ❖ Perifíton | 63 |
| 5.3 ANEXO 3. MONITORAMENTO AMBIENTAL NO RIO DOCE, ÁREA ESTUARINA E MARINHA SISTEMA AQUÁTICO MARINHO | 65 |
| 5.3.1 Matriz coluna d'água..... | 68 |
| ❖ Hidrodinâmica..... | 68 |
| ❖ Material particulado em suspensão | 72 |
| ❖ Parâmetros físico-químicos | 72 |

| | |
|--|------------|
| ❖ Hidrobiológicos (clorofila a e feopigmentos - pigmentos fotossintetizantes)..... | 74 |
| ❖ Compostos orgânicos..... | 74 |
| ❖ Metais..... | 76 |
| ❖ Elementar (particulados)..... | 78 |
| ❖ Isótopos (particulados)..... | 79 |
| 5.3.2 Matriz sedimento superficial..... | 79 |
| ❖ Aspectos físicos (Granulometria e mineralogia)..... | 79 |
| ❖ Parâmetros físicos-químicos..... | 79 |
| ❖ Matéria orgânica..... | 80 |
| ❖ Nutrientes..... | 81 |
| ❖ Metais..... | 82 |
| ❖ Metais totais e terras raras..... | 83 |
| ❖ Compostos orgânicos..... | 83 |
| ❖ Elementar (particulado)..... | 84 |
| ❖ Isótopos (Particulado)..... | 84 |
| 5.3.3 Matriz sedimento testemunho..... | 86 |
| 5.3.4 Matriz biota..... | 87 |
| ❖ Fitoplâncton..... | 87 |
| ❖ Ictioplâncton..... | 91 |
| ❖ Zooplâncton..... | 91 |
| ❖ Bentos marinho de substrato inconsolidado..... | 98 |
| ❖ Fundos recifais, rodolitos e macroalgas..... | 103 |
| 5.3.5 Matriz leito marinho..... | 120 |
| ❖ Sistema de batimetria multifeixe..... | 120 |
| ❖ Sistema sísmico de alta resolução..... | 125 |
| ❖ Vídeo-monitoramento dos habitats..... | 129 |
| 5.4 ANEXO 4. MONITORAMENTO AMBIENTAL NA PRAIA E ANTEPRAIA ADJACENTES À FOZ DO RIO DOCE..... | 132 |
| 5.4.1 Monitoramento morfológico e sedimentológico..... | 134 |
| ❖ Morfologia dos sistemas praias..... | 134 |
| ❖ Sedimentologia dos sistemas praias..... | 136 |
| 5.4.2 Monitoramento da fauna bentônica..... | 137 |
| ❖ Macrofauna..... | 137 |
| ❖ Meiofauna..... | 138 |
| 5.5 ANEXO 5. ALTERAÇÕES ECOLÓGICAS NA DINÂMICA DOS MANGUEZAIS E VEGETAÇÃO DE RESTINGA SOB INFLUÊNCIA DOS SEDIMENTOS PROVENIENTES DO RIO DOCE..... | 138 |
| 5.5.1 Manguezal..... | 138 |
| ❖ Monitoramento da fitossociologia da Vegetação..... | 138 |
| ❖ Monitoramento da Produtividade Primária..... | 142 |
| ❖ Diagnóstico Sobre a Fauna do Manguezal..... | 143 |
| ❖ Diagnóstico de Contaminação da Vegetação do Manguezal por Metais..... | 144 |
| ❖ Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê..... | 146 |
| ❖ Mapeamento dos habitats das espécies de <i>Ucides cordatus</i> e <i>Cardisoma guahumii</i> nos estuários dos Rios Piraquê (Açú e Mirin), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz..... | 147 |

| | |
|--|-----|
| 5.5.2 Restinga | 148 |
| ❖ Inventário da flora e da biota do solo..... | 153 |
| ❖ Levantamento fitossociológico..... | 154 |
| ❖ Análises ecofisiológicas das espécies dominantes | 156 |
| ❖ Análises físico-químicas do solo e tecidos vegetais | 157 |
| 5.6 ANEXO 6. MONITORAMENTO AMBIENTAL DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE | 158 |
| 5.6.1 Monitoramento com veículos aéreos não tripulados (drones) | 158 |
| ❖ Aspectos do Monitoramento | 158 |
| ❖ Aquisição de imagens e vídeos | 165 |
| ❖ Transectos | 165 |
| ❖ Aquisição de dados | 168 |
| ❖ Arquivamento dos vídeos e dados dos voos | 170 |
| 5.6.2 Monitoramento acústico | 173 |
| 5.6.3 Monitoramento com veículos aéreos tripulados | 173 |
| 5.6.4 Monitoramento de aves marinhas | 179 |
| ❖ Captura de aves vivas e acesso às carcaças | 180 |
| ❖ Rastreamento remoto em período reprodutivo | 180 |
| ❖ Rastreamento remoto em período não reprodutivo | 181 |
| ❖ Censos embarcados..... | 181 |
| ❖ Censos de praia..... | 182 |
| ❖ Coleta de dados demográficos nas áreas reprodutivas..... | 183 |
| ❖ Coleta de amostras biológicas..... | 183 |
| 5.6.5 Monitoramento de Cetáceos | 184 |
| ❖ Monitoramento do uso do habitat por cetáceos em áreas adjacentes e da foz do Rio Doce a partir de avistagem por ponto fixo | 184 |
| ❖ Monitoramento do uso do habitat por cetáceos em áreas adjacentes a foz do rio doce a partir de embarques | 186 |
| ❖ Ecotoxicologia, Reprodução, Dieta, Genética, Histopatologia e Microbiologia..... | 192 |
| ❖ Histopatologia..... | 195 |
| ❖ Microbiologia | 195 |
| 5.6.6 Monitoramento de tartarugas marinhas | 196 |
| ❖ Obtenção das amostras de tartarugas em reprodução..... | 196 |
| ❖ Obtenção de amostras de tartarugas juvenis nas áreas de alimentação | 197 |
| ❖ Remessa de amostras..... | 198 |
| 5.7 ANEXO 7. MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA DULCÍCOLA, MARINHA E ESTUARINA | 199 |
| 5.7.1 Sistema aquático dulcícola | 199 |
| ❖ Avaliação ambiental..... | 201 |
| ❖ Avaliação dos parâmetros abióticos | 203 |
| ❖ Esforço de coleta..... | 203 |
| ❖ Acondicionamento dos peixes coletados..... | 203 |
| 5.7.2 Sistema aquático marinho | 204 |

| | |
|--|------------|
| ❖ Amostragem para estudos de composição e estrutura de populações e comunidades de peixes e crustáceos estuarino/marinhos..... | 208 |
| ❖ Amostragem para estudos de microquímica de otólitos | 209 |
| ❖ Amostragem para estudos de ictiofauna recifal | 209 |
| ❖ Recrutamento | 213 |
| ❖ Estudos de telemetria de peixes no estuário do Rio Doce e recifes adjacentes..... | 218 |
| ❖ Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais | 220 |
| 5.8 ANEXO 8. MONITORAMENTO DA SEDIMENTAÇÃO NO PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS E REGIÕES RELACIONADAS..... | 222 |
| 5.8.1 Aspectos do monitoramento..... | 224 |
| 5.8.2 Calibração usando filtragem de MPS e profundidade de Disco de Secchi..... | 225 |
| 5.8.3 Calibração satelital usando o espectrorradiômetro | 226 |
| 5.8.4 Amostragens para análise de MPS..... | 226 |
| 5.8.5 Razão elementar Fe:Mn como marcador da concentração/dispersão da lama de minério da samarco em abrolhos | 226 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 228 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Estações amostrais na porção capixaba do rio Doce e região estuarina..... | 20 |
| Tabela 2. Estações amostrais do Anexo 1 - TR4 na foz do rio Doce e região costeira adjacente..... | 20 |
| Tabela 3. Estações amostrais nas praias adjacentes à foz do rio Doce. | 22 |
| Tabela 4. Estações amostrais nos manguezais. | 22 |
| Tabela 5. Organismos a serem coletados para análises de contaminantes e biomarcadores..... | 32 |
| Tabela 6. Relação dos parâmetros a serem monitorados. | 68 |
| Tabela 7. Relação do número de lançamentos de rede, tempo de arrasto e quantidades de amostras por ponto para cada tipo de amostragem (vertical e oblíquo). | 96 |
| Tabela 8. Áreas de monitoramento e número de parcelas fixas nos manguezais. | 140 |
| Tabela 9. Coordenadas geográficas das oito estações amostrais da formação Restinga do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática I. | 148 |
| Tabela 10. Relação dos parâmetros do monitoramento do ecossistema Restinga. | 151 |
| Tabela 11. Lista de pesquisadores que participarão do trabalho de campo. | 178 |
| Tabela 12: Ficha modelo de monitoramento de cetáceos por ponto fixo..... | 186 |
| Tabela 13. Relação dos parâmetros a serem analisados para cetáceos na área a ser monitorada..... | 192 |
| Tabela 14. Relação dos parâmetros histopatológicos a serem avaliados para os cetáceos na área monitorada. | 195 |
| Tabela 15. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do monitoramento dos ecossistemas aquáticos continentais (Anexo 7). | 201 |
| Tabela 16. Características do habitat utilizados na avaliação de sítios de amostragem para cálculos de índice de integridade de habitat..... | 201 |
| Tabela 17: Sítios de monitoramento da sedimentação no PARNA de Abrolhos e região adjacente. | 225 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----|
| Quadro 1. Termo de Referência 4 Programas de Monitoramento da Biodiversidade Aquática. | 14 |
| Quadro 2. Dados de identificação da equipe embarcada. | 15 |
| Quadro 3. Comparação entre recipientes de vidro (borossilicato) e polietileno polipropileno ou outro polímero inerte. Fonte: Guia Nacional de Coleta e Preservação das águas – ANA..... | 28 |
| Quadro 4. Armazenamento e preservação de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos - Água e sedimento (exemplos de ensaios mais utilizados). Fonte: Guia Nacional de Coleta e Preservação das águas – ANA. | 29 |
| Quadro 5. Lista das famílias de aves estuarinas, de manguezais e da região costeira a serem amostradas no monitoramento de contaminantes, com seu respectivo hábito alimentar e exemplo de espécies a serem priorizadas quando presentes na área amostral. | 46 |
| Quadro 6. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do monitoramento dos ecossistemas aquáticos continentais (Anexo 3)..... | 49 |
| Quadro 7. Relação dos parâmetros físicos, físico-químicos e hidrobiológicos do monitoramento dos ecossistemas aquáticos continentais. | 50 |
| Quadro 8. Coordenadas UTM (datum, SIRGASS 2000) das estações amostrais do monitoramento do ecossistema aquático marinho (Anexo 3). | 66 |
| Quadro 9. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do Monitoramento Integrado dos ecossistemas aquáticos marinhos (Anexo 3)..... | 71 |
| Quadro 10. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do Fundeio de equipamentos do subprojeto Modelagem (Anexo 3). | 72 |
| Quadro 11. Materiais que serão utilizados por estação amostral com 3 profundidades. | 88 |
| Quadro 12. Lista de insumos específicos para realização das coletas (semestral, trimestral e mensal) de zooplâncton. | 93 |
| Quadro 13. Lista de insumos comuns utilizados para coleta de zooplâncton. | 93 |
| Quadro 14. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem a serem monitorados na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente (costa do Espírito Santo e sul da Bahia). | 98 |
| Quadro 15. Malha amostral e tipos de amostragens do sub-projeto Fundos Recifais, Rodolitos e Macroalgas. | 104 |
| Quadro 16: Modelo de rótulo padrão para amostras. | 105 |
| Quadro 17. Coordenadas das estações amostrais para o monitoramento da praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce. Coordenadas em UTM (fuso 24K)..... | 133 |
| Quadro 18. Relação dos parâmetros que serão analisados a partir do levantamento topobatimétrico do perfil praiial e da coleta de sedimento..... | 133 |
| Quadro 19. Materiais e equipamentos utilizados no levantamento topobatimétrico..... | 136 |
| Quadro 20. Inspeção de equipamentos e checklist utilizado antes da decolagem do RPA. | 162 |
| Quadro 21. Inspeção de equipamentos e checklist de voo para pouso. | 164 |
| Quadro 22. Ficha de Campo para o registro de megafauna durante transecto realizado com o Drone Transect. | 168 |
| Quadro 23. Ficha de Campo para o registro do comportamento da megafauna durante voo realizado com o Drone Behavior. | 169 |
| Quadro 24. Informações registradas durante a aproximação de grupo avistado. | 173 |
| Quadro 25. Lista de waypoints de início (costa) e final (mar) das 84 linhas de observação. | 175 |
| Quadro 26. Ficha de cruzeiro de pesquisa. | 189 |
| Quadro 27. Ficha de observação de baleia jubarte. | 190 |
| Quadro 28. Ficha de observação de golfinho. | 191 |
| Quadro 29: Detalhamento do resumo das amostras a serem coletadas. | 194 |
| Quadro 30. Pontos de amostragem da ictiofauna e carcinofauna estuarina/marinha (Anexo 7) nos estuários (rio Piraquê-Açu, rio Doce, rio Ipiranga, rio São Mateus e rio Caravelas) e áreas marinhas adjacentes, localizados ao norte do Espírito Santo e sul da Bahia. | 204 |
| Quadro 31. Parâmetros ambientais a serem medidos em cada ponto de coleta da ictiofauna estuarina/marinha (Anexo 7) nos estuários (rios Piraquê-Açu, Doce, Ipiranga, São Mateus e Caravelas) e áreas marinhas adjacentes, localizados ao norte do Espírito Santo e sul da Bahia | 206 |

| | |
|---|------------|
| Quadro 32. Ficha de campo 1. | 207 |
| Quadro 33. Exemplo de etiqueta para identificação de amostras | 209 |
| Quadro 34: Pontos de amostragem de peixes recifais (Anexo 7) no norte do Espírito Santo e sul da Bahia .. | 210 |
| Quadro 35: Pontos de amostragem de recrutamento de pós-larvas estuarinas (Anexo 7) no norte do Espírito Santo e sul da Bahia | 216 |
| Quadro 36: Pontos de amostragem de recrutamento de pós-larvas recifais (Anexo 7) no sul da Bahia..... | 217 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Malha amostral Anexo 1 – Ecotoxicologia..... | 20 |
| Figura 2. Retirada de rede de zooplâncton após arrasto no Navio de Pesquisa Soloncy Moura. Foto: Joseane A. Marques..... | 35 |
| Figura 3. Retirada do copo com material proveniente de arrasto; (b) concentração e lavagem do material coletado com auxílio de pissete contendo água do local de coleta. Foto: Joseane A. Marques. | 35 |
| Figura 4. Triagem de sedimento para coleta de macrofauna bentônica a bordo do Navio de Pesquisa Soloncy Moura. Foto: Fernando Moraes. | 36 |
| Figura 5. Coleta de pólipos do coral endêmico <i>Mussismillia harttii</i> . Foto: Fernando Moraes. | 37 |
| Figura 6. Fragmentação de pólipos de coral para análise de metais e biomarcadores. Foto: Joseane Marques. | 37 |
| Figura 7. Imagem ilustrativa da coleta de hemolinfa em camarões. Fonte: Anieli C. Maraschi. | 39 |
| Figura 8. Imagem ilustrativa da coleta de hemolinfa em caranguejos. Fonte: Márcio Geihs. | 39 |
| Figura 9. Retirada de rede de pesca após arrasto no Navio de Pesquisa Soloncy Moura. Foto: Fernando Moraes. | 42 |
| Figura 10. Localização da veia caudal para retirada de sangue em peixes. Fotos: Carlos E. D. Vieira. | 43 |
| Figura 11. Imagem ilustrativa da coleta de brânquias em peixes. Foto: Carlos E. D. Vieira. | 44 |
| Figura 12. Representação esquemática da separação do fígado para análises de biomarcadores. | 45 |
| Figura 13. Imagem ilustrativa da coleta de músculo em peixes. Foto: Carlos E. D. Vieira. | 45 |
| Figura 14. Malha amostral dos ecossistemas aquáticos dulcícolas. | 48 |
| Figura 15: Arrasto de rede de fitoplâncton na lagoa Nova. | 61 |
| Figura 16: Amostras quantitativa (esquerda) e qualitativa (direita) da lagoa Nova. | 61 |
| Figura 17. Malha amostral do ecossistema aquático marinho..... | 66 |
| Figura 18. Diagrama do Gravity Core (U. Amri et al. 2015). | 86 |
| Figura 19. Anéis de vedação ou o-ring's (seta vermelha): lado esquerdo (preto) e de silicone transparente, deslocado no lado direito. Fonte: Laboratório de Fitoplâncton (2018). | 90 |
| Figura 20. Sistema de rede de plâncton tipo WP-2 com mecanismo de fechamento. Rede com abertura de malha de 200 micrômetros. | 94 |
| Figura 21. Rede de plâncton tipo bongo com duas redes de abertura de malha de 200 micrômetros e defletor. | 94 |
| Figura 22. Amostragem da coleta de zooplâncton em até 30 metros de profundidade e superior a 30 metros. | 95 |
| Figura 23. Amostragem da coleta de zooplâncton em até 30 metros de profundidade e superior a 30 metros. | 96 |
| Figura 24: Modelo de etiquetas para a coleta de zooplâncton por arrasto vertical e oblíquo. | 98 |
| Figura 25. Posicionamento e abertura da draga no interior do saco plástico; C - retirada do excesso de sedimento com espátula; D - registro fotográfico da amostra. | 102 |
| Figura 26. A - retirada do excesso de ar do saco plástico; B e C - dobras estreitas a partir da abertura até cerca de metade do saco, sem pressionar a amostra; D e E - dobras das duas extremidades em direção ao meio; F - elásticos colocados no saco fechado com as dobras. | 103 |
| Figura 27. Exemplo de dropcameras..... | 107 |
| Figura 28. Fotografias submarinas do quadrado utilizado para a amostragem quantitativa de macroalgas bentônicas. A, quadrado inteiro com suas 15 subunidades; B, detalhe de uma das 15 subunidades. | 109 |
| Figura 29. Instalação e recuperação de estruturas de colonização (CAUs) e dataloggers em Abrolhos. A, instalação de CAUs; B, CAUs e dataloggers recém instalados; C, CAU colonizada após um ano de imersão; D, retirada de CAU envolta em saco plástico para preservar a integridade dos organismos e sedimentos..... | 110 |
| Figura 30. CAU após um ano de colonização, mostrando sua etiqueta inserida no saco antes da remoção. | 112 |
| Figura 31. Preparo de armadilhas de sedimento (esquerda) e instalação em campo (direita). | 114 |
| Figura 32. Rede de Plâncton e Garrafa Niskin para coleta do plâncton. | 117 |
| Figura 33. Bomba a vácuo e filtros para análise de clorofila. | 117 |
| Figura 34. Pistola de ar e amostra de coral para raspagem de tecido..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| Figura 35. Principais componentes do Sistema Multibeam R2 Sonic 2024: 1) Sonar head (Sonic 2024); 2) Modulo de interface sonar (SIM – Sonar Interface Module); 3) POS MV WAVEMASTER II (Georeferenciamento, compensador de movimento); 4) Perfilador de velocidade do som (MiniSVP Sound Velocity Profiler); 5) Sensor de velocidade do som (MiniSVS Sound Velocity Sensors); 6) Software de batimetria o Hypack Max & Hysweep e QPS (QINSy Offshore Bundle); 7) Diversos cabos (Sonar Head, cabos auxiliares, energia, dentre outros); 8) Equipamentos de Informática (monitores, teclado, mouse, filtros de linha, adaptadores, etc. | 122 |
| Figura 36. 1. Antena GPS (A101); 2. Sistema SIG Pulse; 2.1. Fonte de energia SIG Pulse S1; 2.2. Fonte de som (Boomer); 3. SIG Streamer; 3.1. Seção ativa; 3.2. Cabo reboque; 3.3. Caixa de alimentação; 4. Amplificador de transmissão do Chirp; 5. Unidade de interface UASP3C; 6. Transdutor do Chirp; 6.1. Alta frequência (HF - High frequency); 6.2. Baixa frequência (LF - Low frequency); 7. Computador. | 126 |
| Figura 37. Sistema de dropcamera..... | 130 |
| Figura 38. Localização das estações amostrais ao longo do litoral norte do Espírito Santo para o monitoramento da praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce. | 132 |
| Figura 39. Funcionamento de GNSS RTK. | 134 |
| Figura 40. Malha amostral Anexo 5 (Manguezal e Restinga) | 139 |
| Figura 41. Esquema do delineamento amostral apresentado na reunião do dia 28/08 para análises florísticas, fitossociológicas e ecofisiológicas da vegetação de Restinga | 150 |
| Figura 42. Malha amostral Anexo 6 – Megafauna | 158 |
| Figura 43. Drone modelo Mavic 2 Zoom, utilizado para monitoramento da megafauna na foz do rio Doce. | 159 |
| Figura 44. Modelos de transectos para monitoramento da megafauna na região da foz do rio Doce, através de sobrevoos não tripulados..... | 166 |
| Figura 45. Réplica de Toninha (P. blainvillei) utilizada para testes de visualização de megafauna em ambiente natural..... | 168 |
| Figura 46. Mapa da área de estudo apresentando as 84 linhas que serão percorridas em esforço de observação pela equipe de pesquisa a bordo da aeronave de trabalho. | 174 |
| Figura 47: Aeronave que será utilizada nos trabalhos de campo. | 179 |
| Figura 48. Pontos fixos na foz do Rio Piraqueaçu (A) e praia de Santa Cruz (B), Aracruz – ES..... | 185 |
| Figura 49. Pontos fixos na foz do Rio Doce (A) e praia de Regência (B), Linhares – ES..... | 185 |
| Figura 50. Mapa da proposta de transectos para avistagem de cetáceos..... | 187 |
| Figura 51. Malha amostral dos ecossistemas aquáticos dulcícola, estuarino e marinho. | 200 |
| Figura 52. Ficha de campo 2..... | 208 |
| Figura 53: Mapa da amostragem nas áreas recifais para avaliação das dinâmicas populacionais e de assembleia de peixes recifais (pontos verdes) assim como dos locais de colocação das armadilhas de luz para avaliação do recrutamento de peixes marinhos e estuarinos (pontos amarelos) no norte do Espírito Santo e sul da Bahia | 210 |
| Figura 54: Exemplo esquemático de amostragem de assembléia e populações de peixes recifais através de ponto fixo..... | 212 |
| Figura 55: Ilustração do foto-quadrado a ser empregado no estudo. a) Modelo do foto-quadrado a ser utilizado com 15 pequenas fotos identificadas alfanumericamente e a sequência de fotos a serem tiradas, b) Esquema de posicionamento dos foto-quadrados dentro do cilindro dos censos visuais em ponto-fixo. | 213 |
| Figura 56. Desenho esquemático de uma armadilha luminosa do tipo CARE®. Fonte: Ecocean..... | 214 |
| Figura 57: Mapa com a disposição das armadilhas luminosas usadas para o estudo de recrutamento de peixes recifais (1. PABLT= Parcel dos Abrolhos, 2. ABRLT = o arquipélago dos Abrolhos, 3. PPLT= Parcel das Paredes e 4. CALT= Recifes do Arco Costeiro em frente a RESEX do Cassurubá) e estuarinos (5. LTC3= rio Mucuri, LTC2= rio São Mateus, 7. LTI = rio Doce e 8. LTC1= rio Piraquê-Açu) na área Ambiental 1. | 215 |
| Figura 58. Desenho esquemático de como deve ser instalado a armadilha. Fonte: Ecocean | 215 |
| Figura 59: Mapa da amostragem nas áreas recifais e estuarinas para a obtenção de amostras de tecido para estudo de diversidade genética em 15 espécies de peixes | 221 |
| Figura 60. Malha amostral de armadilhas de sedimento Anexo 8 – Abrolhos | 223 |
| Figura 61: Região de amostragem do Anexo 8 para Abrolhos. | 224 |

1 INTRODUÇÃO

O Acordo de Cooperação Técnica-Científica e Financeira celebrado entre a Fundação Espírito-Santense de Tecnologia - FESTA e a Fundação RENOVA para a execução do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área Ambiental I por meio da Rede Rio Doce Mar - RRDM visa verificar a evolução do impacto do rejeito de minério de ferro nos ecossistemas e biodiversidade associada, conforme disposto no Termo de Referência N. 4 e seus anexos (Quadro 1). Para fins de qualificação e padronização das amostragens em campo a RRDM detalha os procedimentos de amostragem, acondicionamento e transporte das amostras, bem como de registro de dados in situ.

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

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

1.1 OBJETIVO GERAL

Detalhar os procedimentos para amostragem em campo e acondicionamento e transportes de amostras de água, sedimento e materiais biológicos.

2 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA SEGURANÇA EMBARCADA

2.1 ATRIBUIÇÕES TÉCNICAS DE EMBARQUE E PROCEDIMENTOS DE SEGURANÇA

Para entrada na embarcação, todos os técnicos devem usar vestimenta adequada para trabalho embarcado. O uso dos EPIs (macacão de manga comprida, sapato com biqueira, óculos de proteção, capacete e protetores auriculares) a bordo é obrigatório. Macacões e sapatos de segurança devem ser usados durante toda a operação.

Nos laboratórios, todas as atividades devem atender normas de segurança que preservem a saúde dos técnicos. Portanto, a equipe de coleta deverá sempre verificar no Protocolo de Coleta, se a sua atividade exige a utilização de óculos de segurança, luvas, capela para lidar com substâncias tóxicas, entre outros.

A equipe técnica embarcada tem a responsabilidade de coletar as amostras e validá-las quanto aos procedimentos amostrais especificados no presente Protocolo. Um dos membros da equipe deverá atuar como coordenador da campanha amostral devendo assegurar a validação de todo o processo de coleta, preservação, tratamento e acondicionamento das amostras, conforme apresentado no Protocolo de Coleta da RRDM e o registro adequado das amostras e dos arquivos, conforme apresentado no Protocolo de Coleta da RRDM. Os técnicos que irão embarcar deverão ter os seguintes dados preenchidos conforme o Quadro 2.

Quadro 2. Dados de identificação da equipe embarcada.

| Nome | Função | Identidade | Instituição de Origem |
|------|--------|------------|-----------------------|
| - | - | - | - |
| - | - | - | - |
| - | - | - | - |
| - | - | - | - |

Cada laboratório deve receber uma lista com a descrição de todas as amostras coletadas, de forma a poder checar o seu recebimento. No momento do recebimento, deve ser verificado o número de volumes recebidos (exemplo 2 isopores) e posteriormente checar o conteúdo. Notificar imediatamente à coordenação do projeto (escritório de projetos) caso existam incoerências. Será preenchida uma planilha similar à apresentada para os parâmetros. Será respeitada a sequência de execução das estações. A tabela deve ser reorganizada por parâmetro ao final de cada campanha amostral.

2.2 RELATÓRIO DE EMBARQUE

A equipe da embarcação será responsável pela geração de um Relatório de Embarque para reportar a conclusão das amostragens ou qualquer problema referente a coleta, acondicionamento ou armazenamento das amostras.

Deverá ser realizado, pelo menos uma vez ao longo das campanhas de amostragem, o registro fotográfico da amostragem, sendo que uma cópia dos arquivos digitais com os procedimentos amostrais sucintamente descritos, com a data e autor da fotografia deverá ser encaminhado ao Escritório de Projetos. O objetivo do registro fotográfico é ilustrar o protocolo de amostragem, e material informativo e portal da RRDM para fins de difusão de informações.

2.3 COMUNICAÇÃO

Eventuais problemas referentes ao desenvolvimento de embarque, procedimentos de segurança ou sobre questões técnicas deverão ser relatados ao coordenador de embarque da RRDM. Os contatos com a equipe da RRDM em terra são:

- Coordenação Técnica – CTEC

Alex Cardoso Bastos (Coordenador Geral) – (27) 98116-2318 / alex.bastos@rrdm.net.br

- Escritório de Projetos

Patrícia Bourguignon Soares - (27) 99975-4214 / patricia@rrdm.net.br

- Núcleo de Atuação Integrada em Rede – NAIR

Caroline Pignaton – (27) 98137-2233 / caroline.pignaton@rrdm.com.br

- Segurança do Trabalho

Acre Fernandes (Responsável pelo SMS) - (27) 98129-2222 / acre.silva@rrdm.net.br

- Ecossistema aquáticos marinhos

Fabian Sá (Professor Departamento de Oceanografia e Ecologia da UFES) - (27) 99747-1878 / fabiannetuno@gmail.com

- Ecossistema aquáticos continentais

Gilberto Fonseca Barroso (Professor Departamento de Oceanografia e Ecologia da UFES) - (27) 99989-5566 / gilberto.barroso@ufes.br

3 PROCEDIMENTOS PARA GARANTIA DA QUALIDADE DA AMOSTRAGEM

A implementação de uma política da qualidade durante todo o processo de obtenção do dado final de ensaios ambientais que fazem parte do escopo do projeto Rede Rio Doce Mar (Programa de monitoramento da biodiversidade aquática na área ambiental I, porção rio doce e região marinha e costeira adjacente) garante uma maior confiabilidade do resultado final, consolidando esta prática como mecanismo fundamental no controle do processo.

O objetivo é definir as sistemáticas para garantir a qualidade dos resultados dos ensaios realizados, baseando-se em requisitos da Norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2017), sempre que aplicável, para monitorar e garantir a qualidade dos mesmos, aplicando para tal diferentes sistemáticas em função das características específicas de cada ensaio.

O protocolo para garantia da qualidade dos resultados demanda documentos técnicos, nos quais são descritas as metodologias padronizadas que são empregadas à matriz analisada, neste caso aos procedimentos de amostragem das diversas matrizes que fazem parte do escopo do projeto. Desta forma, procedimentos técnicos serão apresentados para documentar, padronizar e formalizar as rotinas, etapas, responsabilidades e o modo de executar as metodologias de coleta.

Alguns requisitos são essenciais para garantia da qualidade do resultado final. Processos de decomposição e/ou degradação da amostra podem ocorrer em virtude da incorreta manipulação, coleta, transporte e/ou refrigeração da mesma. Desta forma, as responsabilidades com a qualidade da análise abrangem procedimentos que contemplam desde a coleta da amostra até o resultado final. Qualquer não conformidade que possa afetar o resultado deve ser cautelosamente monitorada a fim de se evitar falhas no processo. Os coordenadores devem certificar-se que todo material, recipiente e/ou instrumento utilizado nas amostragens estejam em perfeitas condições de uso.

4 COLETA, ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

Os responsáveis pela coleta devem garantir a integridade e a rastreabilidade das amostras no intuito de preservar as características das mesmas. Primeiramente, deve-se verificar se os recipientes que acondicionarão as amostras estão devidamente identificados. Os procedimentos de coleta devem ser rigorosamente seguidos conforme descrição.

A embalagem de armazenamento e transporte da(s) amostra(s) deve acondicionar a mesma em seu interior, de forma a manter a correta vedação, conservação da mesma contra a luz, exposição a temperaturas e choques mecânicos, eventuais intempéries e interferentes que possam comprometer a integridade e os resultados das análises.

Para o caso de amostras que requeiram condições de resfriamento, as mesmas devem ser transportadas em temperaturas adequadas, em recipientes isotérmicos, colocados em sacos

plásticos individuais, caso necessário. Devem ser utilizadas caixas rígidas ou de isopor limpas e íntegras, hermeticamente fechadas, a fim de preservar sua estabilidade. O período transcorrido entre a coleta da amostra e sua chegada ao laboratório deve ser o mais breve possível, evitando-se estocagem entre os pontos. A documentação de transporte com as devidas informações deve ser encaminhada externamente a embalagem de transporte e o horário de recebimento das mesmas pelo destinatário deve ser devidamente acordado previamente. O transportador deve ser orientado sobre todas as informações relevantes relativas à embalagem, transporte, documentação e sobre o correto manuseio do material, com o devido cuidado exigido, portando equipamentos de proteção individual, caso necessário. Baseado na compreensão de que a obtenção do resultado inicia a partir da coleta da amostra, a logística de envio e recebimento das amostras tem fundamental importância e devem estar integradas e sincronizadas entre as partes.

As amostras recebidas devem ser registradas no momento de seu recebimento, com codificação unívoca, em formulário específico ou sistema informatizado (estabelecidos pela coordenação geral). Este registro deve incluir informações como data e hora de entrada no laboratório, código de identificação da amostra no laboratório, código de identificação externa, matriz/produto, quantidade de amostra recebida, responsável pelo recebimento, dados amostrais (data e hora da coleta, procedência, ponto de coleta, número de frascos, responsável pela coleta, entrega e recebimento, análises a serem executadas). Avaliar os parâmetros de conformidade com os critérios de qualidade estabelecidos e informar as condições da amostra (se possível, os laboratórios devem manter registros fotográficos das amostras a fim de registrar problemas de embalagem, vazamentos, indícios de violação e contaminação). Caso a amostra não esteja conforme os procedimentos estabelecidos, deve-se prontamente comunicar a não conformidade ao setor responsável, pois erros analíticos não controlados podem descaracterizar o resultado final.

É fundamental que sejam avaliados os seguintes requisitos de recebimento: as amostras devem estar com documentação adequada, acondicionadas em recipientes apropriados, sem sinais de violação ou vazamentos e em estado de conservação aceitável.

Nos casos em que forem recebidas mais de um frasco da mesma amostra, a(s) mesma(s) deve(m) ser identificada(s) com a mesma codificação, acrescida da expressão “CONTRA AMOSTRA”. Estas contra amostras devem ser armazenadas para posterior triagem, se necessário.

Caso as amostras recebidas não forem encaminhadas imediatamente para análise, as mesmas deverão ser armazenadas de forma a preservar seu estado de conservação.

5 PROCEDIMENTOS PARA AMOSTRAGEM EM CAMPO

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

A coleta de água, sedimento e organismos será realizada em duas grandes regiões amostrais: Rio Doce no estado do Espírito Santo, incluindo a região estuarina, e foz do Rio Doce e região costeira adjacente. As 10 estações amostrais na área de abrangência do Rio Doce no estado do Espírito Santo, incluindo a região estuarina, estão apresentados na Figura 1 e na Tabela 1. Por sua vez, os 24 pontos de amostragem na área de abrangência da foz do Rio Doce e região costeira adjacente estão apresentados também na Figura 1 e na Tabela 2. No entanto, é importante lembrar que os ensaios de toxicidade serão realizados somente em 6 locais de amostragem, são eles: pontos 17 e 26 da Tabela 1 e FRD 1, FRD6, CA1 e CA3, da Tabela 2. Assim, estes ensaios cobrirão a porção dulcícola do Rio Doce no Estado do Espírito Santo, bem como, estuário e região costeira adjacente.

O objetivo principal das coletas neste primeiro conjunto de estações de amostragem será o de monitorar os parâmetros físico-químicos e a contaminação por metais, bem como investigar os efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição crônica e aguda e os efeitos biológicos da pluma de sedimentos a partir da foz do Rio Doce. No momento da realização das coletas serão registrados dados comuns, tais como coordenadas geográficas (datum SIRGASS 2000), data, hora e profundidade em que foi realizada a amostragem.

Figura 1. Malha amostral Anexo 1 – Ecotoxicologia

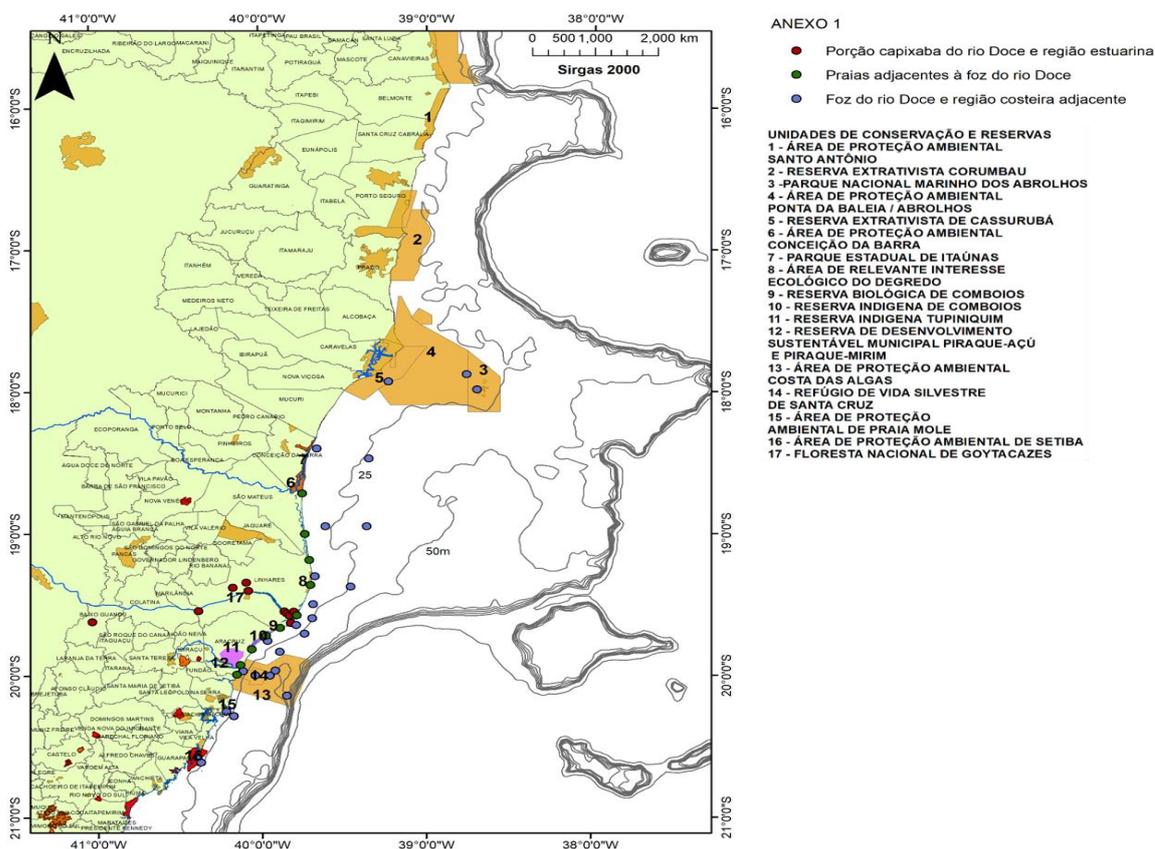


Tabela 1. Estações amostrais na porção capixaba do rio Doce e região estuarina.

| Estação | Local | Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGAS 2000) | |
|---------|-----------------|---|------------|
| | | X | Y |
| 17 | Rio Guandu | 288351,08 | 7828746,17 |
| 18 | Lagoa do Limão | 355688,84 | 7837447,02 |
| 19 | Lagoa Nova | 377287,60 | 7855827,03 |
| 20 | Lagoa Juparanã | 385766,88 | 7859664,14 |
| 21 | Rio Doce | 387144,67 | 7853249,98 |
| 22 | Rio Doce | 410025,62 | 7837309,00 |
| 23 | Lagoa do Areão | 411472,58 | 7835831,65 |
| 24 | Lagoa do Areal | 413154,34 | 7834176,33 |
| 25 | Lagoa Monsaraz | 415912,93 | 7837161,08 |
| 26 | Foz do rio Doce | 414079,86 | 7828234,12 |

Tabela 2. Estações amostrais do Anexo 1 - TR4 na foz do rio Doce e região costeira adjacente.

| Localidade | Ponto | Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGASS2000) | |
|------------|-------|---|---|
| | | X | Y |

| | | | |
|----------------------|-------|-----------|------------|
| Vitória (ES) | VIX 1 | 373370,92 | 7759040,18 |
| - | VIX 2 | 378037,01 | 7755589,67 |
| Barra Nova | BN1 | 462242,81 | 7903846,12 |
| (São Mateus, ES) | BN2 | 435969,74 | 7903774,11 |
| - | ABR1 | 475936,13 | 8017006,73 |
| Abrolhos (BA) | ABR2 | 532065,56 | 8010704,39 |
| - | ABR4 | 525452,40 | 8022616,67 |
| Itaúnas | ITA1 | 430449,20 | 7964547,90 |
| (Conc. da Barra, ES) | ITA2 | 463552,34 | 7956840,44 |
| Degredo | DEG1 | 429405,30 | 7864891,21 |
| (Linhares, ES) | DEG2 | 451968,30 | 7856730,30 |
| - | FRD9 | 428268,74 | 7842923,74 |
| - | FRD6 | 427720,85 | 7832036,66 |
| Foz do rio Doce | FRD1 | 417558,23 | 7826708,46 |
| (Linhares, ES) | FRD3 | 422768,53 | 7819938,12 |
| - | FRD8 | 407208,69 | 7805922,41 |
| - | FRD10 | 399458,35 | 7814269,72 |
| - | CA1 | 384042,73 | 7790616,41 |
| APA Costa das Algas | CA3 | 391745,12 | 7787276,74 |
| e RVS Santa Cruz | CA13 | 404234,57 | 7791153,28 |
| (Aracruz, ES) | CA4 | 401010,39 | 7787200,53 |
| - | CA5 | 411733,92 | 7771576,57 |
| APA de Setiba | GUA1 | 355156,85 | 7723667,77 |
| (Guarapari, ES) | GUA2 | 357393,32 | 7719405,95 |

O monitoramento das praias adjacentes à desembocadura do Rio Doce será realizado com coletas de água, sedimentos e biota para análises da contaminação por metais e resposta de biomarcadores. A área de abrangência do monitoramento químico e biológico das praias ao longo do litoral será entre os municípios de Aracruz e São Mateus. Foram estabelecidas 10 estações amostrais ao longo deste litoral (Figura 1 e Tabela 3). As estações ao longo da planície do Rio Doce estão localizadas na área da Reserva Biológica de Comboios e ao sul, no litoral de Aracruz, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz.

Tabela 3. Estações amostrais nas praias adjacentes à foz do rio Doce.

| Estações amostrais | Coordenadas UTM (datum SIRGAS 2000) | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|---------|-----------|------------|
| | X | Y | X | Y |
| Aracruz 1: Refúgio | 380522 | 7790153 | 379908,15 | 7787892,37 |
| Aracruz 2: Padres | 385022 | 7798479 | 382269,99 | 7795558,41 |
| Doce Sul 1: Barra do Riacho | 389666 | 7808931 | 389346,33 | 787767,56 |
| Doce Sul 2: Comboios | 398484 | 7818546 | 398483,36 | 7818546,19 |
| Doce Sul 3: Regência | 407417 | 7824461 | 407416,09 | 7824460,93 |
| Doce Norte 1: Povoação | 426647 | 7857980 | 417863,32 | 7834350,26 |
| Doce Norte 2: Vila de Cacimbas | 426487 | 7857326 | 426646,32 | 7857980,26 |
| Doce Norte 3: Pontal do Ipiranga | 425785 | 7877396 | 425784,32 | 7877396,26 |
| Doce Norte 4: Urussuquara | 423027 | 7897769 | 423026,32 | 7897769,26 |
| Doce Norte 5: Guriri | 421309 | 7929528 | 421308,32 | 7929528,26 |

No que se refere aos manguezais, conforme descrito no Apêndice V do Plano de Trabalho (Alterações Ecológicas na Dinâmica dos Manguezais e Vegetação de Restinga sob Influência dos Sedimentos Provenientes do Rio Doce), o monitoramento será realizado em sete pontos de amostragem na área de influência direta do desastre ambiental do Rio Doce (foz), bem como nas áreas de influência consideradas atualmente como indiretas, a saber: Rios Piraquê (Açu e Mirim), manguezais de franja na área do Refúgio de Vida Silvestre (RVS) de Santa Cruz, foz do Rio Doce, Rio Urussuquara, Rio Mariricu, Rio São Mateus e Rio Caravelas (

Tabela 4).

Tabela 4. Estações amostrais nos manguezais.

| Estações amostrais | Coordenadas UTM (datum SIRGAS 2000) | |
|--|-------------------------------------|-----------|
| | X | Y |
| Confluência dos Rios Piraquê Açu e Mirim | 377123,21 | 779384,19 |
| RVS de Santa Cruz | 381445,62 | 779180,69 |
| Foz do Rio Doce (Regência) | 413373,91 | 782798,20 |
| Rio Urussuquara | 424243,94 | 788819,59 |
| Rio Mariricu | 422327,63 | 790414,46 |
| Rio São Mateus | 422676,22 | 794358,54 |
| Rio Caravelas | 476622,96 | 803684,20 |

5.1.1 Matriz coluna d'água

As coletas de água no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, bem como no ambiente praias serão realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal de Niskin com capacidade de 3 L. As coletas serão realizadas nas seguintes profundidades:

- Superfície: 0 a 15 cm da superfície;
- Fundo: cerca de 50 cm acima do fundo, conforme a profundidade do local de coleta.

Em todos os pontos serão coletadas amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo) para a análises que serão realizadas nas frações total e dissolvida.

❖ Coletas para determinações físico-químicas

No momento da coleta das amostras de água no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, bem como no ambiente praias serão realizadas as medidas da temperatura, condutividade elétrica (salinidade), pH e oxigênio dissolvido, utilizando-se uma sonda multiparâmetros (YSI Multiparameter Sonde®). As coletas de água para a determinação dos parâmetros físico-químicos serão realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal de Niskin.

Em cada local de amostragem serão coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL para cada alíquota). Imediatamente após a coleta, as amostras, devidamente identificadas, serão acondicionadas e congeladas, para posterior determinação laboratorial da alcalinidade e concentrações de sulfato e cloretos.

❖ Metais e composição iônica

As coletas de água para a determinação das concentrações totais de metais serão realizadas utilizando-se uma garrafa horizontal de Niskin com capacidade de 3 L. Em cada local de amostragem serão coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL para cada alíquota). Imediatamente após a coleta, as amostras serão acidificadas com ácido nítrico Suprapur® (HNO₃, concentração final de 1% - ex. para cada 50 mL de água adiciona-se 700 µL do ácido nítrico a 65%) e mantidas congeladas até o momento das análises em laboratório.

Em todas as amostras de água serão analisadas as concentrações de arsênio (As), dos metais cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), bem como dos íons magnésio (Mg), potássio (K), cálcio (Ca) e sódio (Na).

❖ Metais, íons e carbono orgânico dissolvido (COD)

Em cada local de amostragem serão coletadas 6 amostras de água (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo; 50 mL de cada amostra). Imediatamente após as coletas, as amostras serão

filtradas (filtro de acetato de celulose de 0,45 μm de poro). Após a filtração, as amostras serão acidificadas com ácido nítrico Suprapur[®] (HNO_3 , concentração final de 1%) e mantidas congeladas e na ausência de luz em frascos âmbar, para a determinação de COD.

Em todas as amostras de água serão analisadas as concentrações de arsênio (As), dos metais cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn), bem como dos íons magnésio (Mg), (potássio) K, cálcio (Ca) e sódio (Na).

5.1.2 Matriz sedimento superficial

Em cada ponto de coleta no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário, na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, bem como no ambiente praias, serão coletadas amostras de sedimento, utilizando-se draga do tipo Van Veen, Box-corer, pá ou bomba de sucção, dependendo do ambiente amostral, das condições de coleta e do tipo de determinação a ser realizada (concentrações de metais ou triagem de organismos).

Em cada local de amostragem, serão coletadas 4 amostras de sedimento. Imediatamente após a coleta, as amostras serão fotografadas, a fim de registrar as características visuais do sedimento. Em seguida, as amostras serão triadas em caixas plásticas, buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento.

❖ Metais

Para a determinação das concentrações de metais, as amostras, após estarem dispostas nas bandejas plásticas, serão coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5 cm) da amostra de sedimento, obtendo-se assim apenas o sedimento superficial. Se manterá o cuidado de selecionar apenas a alíquota de sedimento que não esteve em contato com as paredes do objeto de coleta (draga, box-corer, pá, etc.). Para cada amostra, serão coletados aproximadamente 50 g de sedimento, os quais serão acondicionados e armazenados em pote plástico e mantidos congelados até o momento das análises.

Em todas as amostras de sedimento, serão analisados o arsênio (As) e os metais cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn).

❖ Triagem de organismos

Após a retirada da alíquota de 50 g de sedimentos para a determinação das concentrações de metais, os sedimentos serão transferidos para uma tela de malha de 500 μm , para que sejam separados/triados os organismos-alvo (i.e., poliquetos, anfípodos, isópodos, moluscos e larvas de quironomídeos).

5.1.3 Matriz água e sedimento para os ensaios ecotoxicológicos

Os procedimentos considerados abaixo foram baseados no Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da Agência Nacional das Águas (ANA) / 2011, bem como na Norma ABNT NBR 15469 – 12/2015 de coleta, preservação e preparo de amostras para ensaios de toxicidade.

❖ Considerações sobre coleta de água bruta e sedimento

É preciso considerar que todo corpo d'água é heterogêneo e que, seja qual for o local de amostragem, este não é representativo de todo o sistema em estudo. Por esse motivo, devem ser selecionados locais adequados às necessidades de informação de cada programa.

Qualquer que seja o tipo de ambiente amostrado, a coleta para avaliação da qualidade de sedimentos (biológica, física e química) geralmente ocorre nas áreas de deposição de sedimentos finos (argila), já que normalmente são nesses locais que os contaminantes são retidos e a comunidade bentônica é mais desenvolvida. Em lagos, reservatórios e estuários o acúmulo de partículas finas ocorre na região mais profunda; em rios, nas margens deposicionais e nas áreas de remansos. Em estudos de sedimento há de se considerar também a variabilidade temporal, já que as variações sazonais podem influenciar a disponibilidade de contaminantes. Em reservatórios, a dinâmica de circulação/ estratificação altera a relação de oxirredução das camadas profundas de água e, em períodos de seca, a exposição do sedimento marginal. Em rios, ocorre deposição de sedimentos finos no período da seca e lavagem desse material nas chuvas.

❖ Limpeza e preparo dos recipientes

A limpeza dos recipientes, tampas e batoques é de grande importância para impedir a introdução de outros contaminantes nas amostras de interesse. Portanto, deve-se garantir que os procedimentos de lavagem sejam eficazes para a limpeza e não acrescentem interferentes nos resultados ecotoxicológicos e analíticos. Para a limpeza básica:

- Deixar os frascos, tampas e batoques de molho em solução de detergente alcalino 0,1% (Extran) por tempo suficiente para facilitar a remoção dos resíduos da amostra e possíveis etiquetas;
- Esfregar os frascos com gaspilhão ou esponja para retirada total dos resíduos;
- Enxaguar com água corrente para retirada do detergente (se necessário, usar água quente);
- Realizar enxague final com água destilada ou deionizada;
- Colocar em estufa entre 70°C e 100°C, durante duas horas, para secagem ou deixá-los secar à temperatura ambiente com a boca para baixo sobre papel filtro absorvente;
- Tampar e armazenar em local apropriado (livre de poeira).
- No caso de recipientes novos descartáveis ou de vidro, enxaguar cada frasco, tampa e batoque com água destilada ou deionizada previamente ao uso. Normalmente este procedimento é suficiente para garantir a limpeza dos frascos novos.

❖ Coleta de amostras

- Verificar a limpeza dos frascos e dos demais materiais e equipamentos que serão utilizados para coleta (baldes, garrafas, pipetas, etc). O material novo deve ser previamente lavado com água destilada. Material usado anteriormente deve ser previamente descontaminado. A descontaminação inclui lavagem com sabão neutro (Extran), hipoclorito, ácido nítrico 1 %, água corrente e água destilada, nesta ordem.
- Empregar os frascos seguindo características das amostras e recomendações descritas na Tabela 5;
- Evitar tocar as tampas e batoques com a mão, ou expor os frascos à pó, fumaça e outras impurezas (por exemplo, gasolina, óleo e fumaça de exaustão de veículos nas proximidades);
- Cinzas e fumaça de cigarro podem contaminar as amostras com metais pesados e fosfatos, entre outras substâncias. Portanto, é importante que os responsáveis pela coleta de amostras não fumem durante a coleta e utilizem equipamento de proteção individual (EPI) adequados para cada tipo de amostragem (avental, luva cirúrgica ou de borracha de látex, óculos de proteção, entre outros);
- Fazer a ambientação dos equipamentos de coleta com água do próprio local, se necessário;
- Garantir que as amostras líquidas não contenham partículas grandes, detritos, folhas ou outro tipo de material acidental durante a coleta;
- Coletar um volume suficiente de amostra para eventual necessidade de se repetir algum ensaio no laboratório;
- Colocar as amostras ao abrigo da luz solar, imediatamente após a coleta;
- Acondicionar as amostras em caixas térmicas com gelo ou congelar imediatamente, caso haja possibilidade, para preservação das mesmas;
- Fazer determinações de campo em alíquotas de amostra separadas das que serão enviadas ao laboratório para os ensaios, evitando-se assim o risco de contaminação. Estas determinações estão descritas no item abaixo e devem ser feitas com amostras frescas, recém-coletadas;
- As informações de campo devem ser registradas nas fichas de coleta. Cada ponto amostral deve ter sua ficha individual, contendo os seguintes dados:
 - Nome do programa de amostragem e do coordenador ou responsável pela coleta, com telefone para contato;
 - Nome dos indivíduos / técnicos que realizaram a coleta;
 - Identificação do ponto de amostragem: código do ponto, endereço, georeferenciamento, etc.
 - Data e hora da coleta;
 - Natureza da amostra (água tratada, nascente, poço freático, poço profundo, represa, rio, lago, efluente industrial, água salobra, água salina, sedimento, etc);
 - Medidas de campo (temperatura do ar e da água, pH, condutividade, oxigênio dissolvido, transparência, coloração visual, vazão, etc);
 - Eventuais observações de campo;

- Condições meteorológicas nas últimas 24 horas que possam interferir com a qualidade da água (chuvas);
- Indicação dos parâmetros a serem analisados no laboratório;
- Equipamento utilizado (nome, tamanho, malha, capacidade, volume filtrado, e outras informações relevantes).

❖ Equipamentos de amostragem

A garrafa horizontal de Niskin será usada para coleta de amostras na superfície (0 a 15 cm da superfície) para os ensaios de toxicidade. Este tipo de amostrador é indicado para ensaios que requerem pequenos volumes de amostra.

A draga do tipo Van Veen e o box-corer são equipamentos apropriados para amostragem de sedimento e serão usadas tanto no ambiente de água doce quanto estuarino e marinho. O braço retrátil destes equipamentos permite que se alcance o local desejado para coleta, mesmo permanecendo na margem ou superfície.

❖ Procedimentos para coleta de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos em águas superficiais:

É necessário preencher todo o volume do frasco de armazenamento, previamente identificado, sem deixar volume morto, de maneira a evitar a presença de ar.

O frasco deve ser vedado imediatamente após a amostragem, e deixado em repouso por alguns minutos e para verificação da existência de bolhas de ar no seu interior. Caso haja presença de bolhas, bater levemente nas laterais do frasco, visando o desprendimento das mesmas e completar o volume do frasco, se necessário.

A amostra de ser acondicionada em caixa térmica com gelo ou congelar imediatamente, se possível (ver adiante).

❖ Procedimentos para coleta de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos em sedimento:

- Após a coleta do sedimento com a draga ou box-corer, remover o sedimento para o frasco de armazenamento, previamente identificado, com cuidado de selecionar apenas alíquotas de sedimento que não estiverem em contato com as paredes do objeto de coleta;
- Preencher todo o frasco com sedimento;
- Desprezar o restante do sedimento no local de amostragem;
- Acondicionar a amostra em caixa térmica com gelo ou congelar imediatamente, se possível (ver adiante).

❖ **Preservação de amostras**

- Independente da natureza da amostra, a estabilidade completa para cada constituinte nunca pode ser obtida. As técnicas de preservação, a seleção adequada dos frascos e a forma de armazenamento, têm por objetivo retardar a ação biológica e a alteração dos compostos químicos; reduzir a volatilidade ou precipitação dos constituintes e os efeitos de adsorção em todas as etapas da amostragem (coleta, acondicionamento, transporte, armazenamento, até o momento do ensaio);
- A preservação de amostras da água bruta e sedimento que utilizaremos no presente programa é o procedimento de congelamento;
- O procedimento de congelamento é permitido para ensaios ecotoxicológicos com água bruta e sedimento, e serve para aumentar o intervalo entre a coleta e o ensaio da amostra in natura, sem comprometer esta última.

❖ **Acondicionamento, transporte e armazenamento de amostras**

Os tipos de recipientes mais utilizados para coleta e preservação de amostras são os de plástico autoclavável de alta densidade (polietileno, polipropileno, policarbonato ou outro polímero inerte) e os de vidro, com boca larga (mais ou menos 4 cm de diâmetro) para facilitar a coleta da amostra e a limpeza. As características de ambos os recipientes são apresentadas no Quadro 3. Neste programa de coleta, usaremos recipientes plásticos para o acondicionamento e armazenamento das amostras;

Quadro 3. Comparação entre recipientes de vidro (borossilicato) e polietileno polipropileno ou outro polímero inerte. Fonte: Guia Nacional de Coleta e Preservação das águas – ANA.

| Condições Operacionais | Material | |
|-----------------------------|---|---|
| | Vidro (Borossilicato) | Plástico (polímero inerte) |
| Interferência com a amostra | Indicado para todas as análises de compostos orgânicos. Inerte a maioria dos constituintes, exceto à forte alcalinidade. Adsorve metais em sua parede | Indicado para a maioria dos compostos inorgânicos, biológicos e microbiológicos. |
| Peso | Pesado | Leve |
| Resistência à quebra | Muito frágil | Durável |
| Limpeza | Fácil | Dificuldade na remoção de componentes adsorvíveis |
| Esterilizável | Sim | Apenas por técnicas de uso pouco comum no Brasil, como óxido de etileno e radiação gama. Alguns tipos são autoclaváveis |

A capacidade dos recipientes varia em função do volume de amostra necessário para os ensaios ecotoxicológicos. É fundamental que tanto o recipiente, como a tampa e o batoque estejam livres do analito de interesse, especialmente quando os limites de quantificação são baixos. Como regra geral, as tampas e os batoques devem garantir uma boa vedação da amostra, especialmente durante o transporte.

Na maioria dos casos, as amostras devem ser transportadas em refrigeração. Procedimentos de controle de temperatura devem ser realizados para garantir que o sistema adotado é eficiente, tais como: medida da temperatura de frasco controle ou utilização de datalog na caixa térmica, equipamentos esses adequadamente calibrados.

As amostras devem ser analisadas o mais rapidamente possível, quando da sua chegada ao laboratório; entretanto, em determinadas situações, as amostras que possuem prazo de validade mais longos podem ser armazenadas em câmara fria, geladeira ou freezer até o momento do ensaio, sendo que a temperatura desses equipamentos deve ser controlada por termômetros calibrados. O Quadro 4 resume as condições de armazenamento das amostras.

Quadro 4. Armazenamento e preservação de amostras para ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos - Água e sedimento (exemplos de ensaios mais utilizados). Fonte: Guia Nacional de Coleta e Preservação das águas – ANA.

| Classe da Amostra | Preservação | Armazenamento | Prazo de validade |
|------------------------|---------------------------------|--|-------------------|
| Água Bruta | Resfriamento (em gelo) | Resfriamento (em gelo) | 12 horas |
| Sedimento | | Resfriamento < 10°C, sem congelamento | 48 horas |
| | | Congelamento a < 10°C, 48h após a coleta | 60 dias |
| Elutriado do sedimento | Realizado previamente ao ensaio | Resfriamento < 10°C, sem congelamento | 24 horas |

5.1.4 Matriz água para análises microbiológicas

Serão coletadas amostras de água nos pontos de amostragem no Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário (Tabela 1), bem como da foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Tabela 2). As coletas serão realizadas e as amostras processadas de acordo com o protocolo a seguir.

❖ Coleta das amostras de água

Em cada ponto de amostragem, com auxílio de uma garrafa horizontal de Niskin, serão coletadas amostras de água na superfície (0 a 15 cm da superfície) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo, conforme a profundidade do local de coleta). Serão coletadas 6 amostras (3 amostras de superfície e 3 amostras de fundo), contendo 1L cada amostra.

As amostras coletadas serão transferidas para garrafas plásticas de 1 L identificadas de acordo com o ponto de coleta, réplica e profundidade, (sugestão: Estação 1 da superfície = Amostra 1. [a, b ou c]; Estação 1 do fundo = Amostra 1.[d, e ou f]).

As amostras coletadas serão acondicionadas em ambiente fresco ou refrigerado até o momento da filtração.

❖ Procedimentos de campo importantes para filtração e estocagem

- Utilizar luvas durante todo o procedimento de filtração (passar álcool 70% nas luvas de uma amostra para outra).
- Passar álcool 70% nas pinças e flambar antes de utiliza-las em outra amostra.
- Entre amostras, lavar o sistema de filtração com álcool 70% e após rinsar o sistema com parte da água a ser filtrada em seguida.
- Após a filtração da amostra nas duas membranas (1.2 µm e 0.22 µm) e não havendo problemas durante a filtração, as amostras de água que sobraram podem ser descartadas. Caso ocorra problemas durante a filtração utilizar o volume extra de água para filtrar novamente o ponto coletado (utilizando novas membranas de filtração caso necessário).
- A identificação das amostras deve ser realizada da seguinte forma: Identificação da estação de coleta (1-6)/ Identificação da profundidade (superfície: a-c; fundo: d-f)/ Identificação do filtro utilizado, quando necessário (1.2 µm ou 0.22 µm) .: exemplos: 2.b/ 3.a/ 5.f/ 6.d/ 5.e-1.2/ 5.a-0.22.
- Os tubos de 5ml com as membranas contendo o filtrado deverão ser estocados em caixas específicas para tais tubos (providenciados) e então congelados (-20°C).

5.1.5 Matriz sedimento para análises microbiológicas

As amostras de sedimento serão coletadas nos pontos de amostragem do Rio Doce no estado do Espírito Santo e estuário (Tabela 1), bem como da foz do Rio Doce e região costeira adjacente (Tabela 2). As coletas serão realizadas e as amostras processadas de acordo com o protocolo a seguir.

❖ Procedimentos importantes para coleta e estocagem

- Utilizar luvas durante todo o procedimento de coleta (passar álcool 70% nas luvas de uma amostra para outra).
- Passar álcool 70% nas espátulas antes de utiliza-las em outra amostra.
- A identificação das amostras deve ser realizada da seguinte forma: Identificação do ponto de coleta (1-6)/ Identificação da réplica (a-c)/.: exemplos: 2.b/ 3.a/ 5.c.
- Os tubos falcon de 15 ml contendo as amostras coletadas deverão ser estocados em sacos plásticos (providenciados) e então congelados (-20°C).

❖ Coleta das amostras de sedimento

- Serão coletadas amostras de sedimentos com auxílio de draga do tipo Van Veen. Em cada local de amostragem serão coletadas 3 amostras de sedimento.
- As amostras serão abertas em caixas plásticas. As amostras serão coletadas com auxílio de espátulas de metal, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5 cm) da amostra de sedimento.
- Com o auxílio das espátulas o sedimento será transferido para tubos Falcon de 15 ml, objetivando-se preencher todo o tubo. Após isso, os tubos serão identificados e congelados (-20°C).

5.1.6 Matriz biota (coral) para as análises microbiológicas

Serão coletadas amostras de corais nos pontos de amostragem no Parque Nacional Marinho de Abrolhos (Tabela 2). As coletas serão realizadas e as amostras processadas de acordo com o protocolo a seguir.

❖ Procedimentos importantes para coleta e estocagem:

- Utilizar luvas durante todo o procedimento de coleta (transferência dos pedaços de corais para os tubos de 5 ml ou 50 ml),
- A identificação das amostras deve ser realizada da seguinte forma: Identificação do ponto de coleta (1-6)/ Identificação da espécie (Mil para *Millepora alcicornis*; Mus para *Mussismilia harttii*)/ Identificação da réplica (a-f)/.: exemplos: 2-Mil-b/ 3-Mus-f/ 5-Mil-d.
- Os tubos de 5 ml ou 50 ml contendo as amostras coletadas deverão ser estocados e então congelados (-20°C).

❖ Coleta das amostras de corais

- Coletas manuais de corais serão realizadas através de mergulho autônomo. Serão coletadas 12 amostras por ponto de coleta (6 amostras de cada espécie de coral - *Millepora alcicornis* e *Mussismilia harttii*)
- As amostras serão coletadas e armazenadas em tubos de 5 ml ou tubos tipo Falcon de 50 ml, dependendo da logística dos mergulhadores e tamanho dos fragmentos.
- Quando no barco, o excesso de água será retirado dos tubos. Os tubos serão identificados e congelados (-20°C).

5.1.7 Matriz biota para análises de contaminantes e biomarcadores

A coleta de material biológico foi permitida pela autorização para captura, coleta e transporte de material biológico número n°. 64261-1, expedida pelo Sistema de Autorização e Informação e Biodiversidade – SISBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Ministério do Meio Ambiente – MMA. A Tabela 5 lista os organismos que serão coletados no escopo

do Anexo I, para cada ambiente amostral, à exceção das aves (Quadro 5). A metodologia específica para captura, coleta, processamento e armazenamento das amostras de material biológico, de cada táxon, segue detalhada em sequência.

Tabela 5. Organismos a serem coletados para análises de contaminantes e biomarcadores.

| Ambientes | Organismos | N para metais/ponto de coleta | N para biomarcadores/ponto de coleta |
|--------------------|---|--------------------------------------|---|
| Rio Doce (ES) | Fitoplâncton | 5 (pools) | 5 (pools) |
| (9 Estações) | Zooplâncton | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | Larvas de quironomídeos | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | Girinos | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | <i>Cichla sp.</i> (tucunaré) | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | <i>Prochilodus sp.</i> (Curimatá) | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | <i>Pimelodus maculatus</i> (mandi-amarelo) | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | <i>Hypostomus affinis</i> (cascudo) | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | Camarão de água doce | 6 hemolinfas | 6 hemolinfas |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| Estuário (1 ponto) | <i>Eucinostomus sp.</i> (carapicu) | 6 fígados | 6 fígados |
| | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| | | 6 músculos | 6 músculos |
| | | 6 sangues | 6 sangues |
| | <i>Pachyurus adspersus</i> (corvina) | 6 fígados | 6 fígados |
| | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| | | 6 músculos | 6 músculos |
| | | 6 sangues | 6 sangues |

| Ambientes | Organismos | N para metais/ponto de coleta | N para biomarcadores/ponto de coleta |
|--|---|-------------------------------|--------------------------------------|
| Estuário (1 ponto) | <i>Pomadasy s ramosus</i> (bicudo) | 6 fígados | 6 fígados |
| | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| | | 6 músculos | 6 músculos |
| | | 6 sangues | 6 sangues |
| | <i>Genidens genidens</i> (bagre caçari) | 6 fígados | 6 fígados |
| | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| | | 6 músculos | 6 músculos |
| | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | Camarão | 6 hemolinhas | 6 hemolinhas |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| Ambiente praial (10 Estações) | Poliqueto | 6 | 6 |
| - | Anfípodo | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | Isópodo | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | <i>Ocypode quadrata</i> (Caranguejo Maria-farinha) | 6 hemolinhas | 6 hemolinhas |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| Manguezais (7 Estações) | <i>Cardisoma guanhumi</i> (Guaiamu) | 6 hemolinhas | 6 hemolinhas |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| - | <i>Ucides cordatus</i> (Caranguejos-uçá) | 6 hemolinhas | 6 hemolinhas |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| Foz do Rio Doce e Região costeira adjacente (24 Estações) | Fitoplâncton | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | Zooplâncton | 5 (pools) | 5 (pools) |
| - | Hidrocorais (<i>Millepora alcicornis</i>)* | 6 | 6 |
| - | Corais (<i>Mussismilia hartii</i>)* | 6 | 6 |
| - | Poliqueto | 6 | 6 |
| - | Moluscos | 6 | 6 |
| - | <i>Farfantepenaeus</i> | 6 hemolinhas | 6 hemolinhas |

| | | | |
|------------------|---|--------------------------------------|---|
| | <i>paulensis</i> | | |
| - | <i>F. brasiliensis</i> | 6 músculos | 6 músculos |
| - | (<i>camarão-rosa</i>) | 6 brânquias | 6 brânquias |
| Ambientes | Organismos | N para metais/ponto de coleta | N para biomarcadores/ponto de coleta |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| - | <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> | 6 hemolinfas | 6 hemolinfas |
| - | (<i>camarão sete-barbas</i>) | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 hepatopâncreas | 6 hepatopâncreas |
| - | <i>Conodon nobilis</i> (<i>roncador</i>) | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | <i>Cynoscion</i> <i>sp. (pescadinha)</i> | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | <i>Balistes capriscus</i> (<i>peroá</i>) | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |
| - | Linguado sem mancha | 6 fígados | 6 fígados |
| - | | 6 brânquias | 6 brânquias |
| - | | 6 músculos | 6 músculos |
| - | | 6 sangues | 6 sangues |

*organismos coletados somente no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos.

❖ Fitoplâncton e Zooplâncton

Para as coletas de zooplâncton serão realizados arrastos verticais oblíquos com rede tipo WP-2, de 60 cm de diâmetro de boca e malha de 200 µm (Figura 2). Para o fitoplâncton, serão realizados arrastos verticais oblíquos com rede de malha de 60 µm e diâmetro de boca de 60 cm.

O material obtido em cada arrasto será retirado dos copos coletores com auxílio de peneiras e pissetes com água do ponto de coleta (Figura 3). Primeiramente o material será filtrado em peneiras de 500 µm para retirada de peixes, águas-vivas e outros organismos ou partículas grandes, e então por peneira de 63 µm para concentração do material. O material resultante será dividido em tubos criogênicos, devidamente identificados, para análise da concentração de metais e para análise de biomarcadores, e mantidos em nitrogênio líquido até transporte para a Universidade Federal do Rio Grande. Serão realizados no total 5 arrastos para fitoplâncton e 5 arrastos para zooplâncton (15 min de duração cada arrasto).

Figura 2. Retirada de rede de zooplâncton após arrasto no Navio de Pesquisa Soloncy Moura. Foto: Joseane A. Marques.



Figura 3. Retirada do copo com material proveniente de arrasto; (b) concentração e lavagem do material coletado com auxílio de pissete contendo água do local de coleta. Foto: Joseane A. Marques.



❖ Invertebrados bentônicos

Para as coletas de macroinvertebrados infaunais, amostras de sedimento superficial serão coletadas com auxílio de draga de fundo do tipo Van Veen (nos pontos localizados no Rio Doce no estado do Espírito Santo e região estuarina, bem como nos pontos localizados na foz do Rio Doce e região costeira adjacente), ou pás (nos pontos localizados nas praias).

O sedimento coletado será passado por peneira de 500 μm visando a concentração de organismos da macrofauna bêntica e distribuído em bandejas com água do local de coleta. Os organismos alvo serão triados manualmente com pinças de plástico ou aço inoxidável, e coletados para análise da concentração de metais e para análise de biomarcadores (Figura 4). As espécies macrofaunais (preferencialmente espécies de poliquetas, moluscos e microcrustáceos) que ocorrerem com densidade suficiente para as análises planejadas, serão coletadas em pools (n = 6) e mantidas em nitrogênio líquido, até o transporte para a Universidade Federal do Rio Grande.

Figura 4. Triagem de sedimento para coleta de macrofauna bentônica a bordo do Navio de Pesquisa Soloncy Moura. Foto: Fernando Moraes.



❖ Corais e hidrocorais

Com auxílio de mergulho autônomo, seis colônias diferentes do coral *Mussismilia harttii* e do hidrocoral *Millepora alcicornis* serão identificadas em cada ponto de amostragem do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos. Um pólipos de cada colônia será coletado manualmente e mantido em sacos ziplock® com água do local (Figura 5). O material será levado ao navio/barco de apoio, fragmentado com alicate de aço inoxidável e distribuído para análises da concentração de metais, análise de biomarcadores e de microbiota associada (Figura 6). As amostras serão mantidas em nitrogênio líquido até transporte para a Universidade Federal do Rio Grande (análises das concentrações de metais e biomarcadores) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (análise microbiológica).

Figura 5. Coleta de pólipos do coral endêmico *Mussismillia harttii*. Foto: Fernando Moraes.



Figura 6. Fragmentação de pólipos de coral para análise de metais e biomarcadores. Foto: Joseane Marques.



❖ Crustáceos

Serão coletadas três espécies de camarão marinho, a saber *Farfantepenaeus paulensis* ou *Farfantepenaeus brasiliensis* (ambos camarão-rosa), *Xiphopenaeus kroyeri* (camarão sete-barbas), uma espécie de camarão dulcícola e uma espécie estuarina. Nos manguezais, caranguejos guaiamu (*Cardisoma guanhumi*) e caranguejos-uçá (*Ucides cordatus*) serão coletados nos 7 pontos de amostragem, conforme os procedimentos descritos no Apêndice V (Estudo e monitoramento de manguezais - Alterações Ecológicas na Dinâmica dos Manguezais sob influência dos sedimentos provenientes do Rio Doce: Barra Nova à Aracruz). No ambiente praial, serão coletados caranguejos da espécie *Ocyroide quadrata* nos 10 pontos de amostragem.

Caso não seja possível a coleta das espécies listadas acima, as mesmas serão substituídas por outras espécies que ocupem o mesmo habitat. A coleta de crustáceos será realizada, com utilização dos mais diversos petrechos de pesca, conforme o ambiente permitir (ex: redes de cerco, redes de arrasto).

Os crustáceos coletados serão previamente crioplanados (~2 min) e serão mensurados o comprimento total (rosto ao telson para camarões e largura da carapaça para caranguejos) e a massa (g) (n = 6 para cada espécie).

As amostras de hemolinfa e tecidos (brânquias, músculo e hepatopâncreas) para a análise de metais e íons dos camarões e caranguejos serão coletadas utilizando-se material cirúrgico inoxidável ou plástico. As amostras serão acondicionadas em microtubos ou tubos tipo Falcon, previamente limpos com ácido nítrico Suprapur® e enxaguados em água MilliQ. As amostras coletadas para as análises de metais e íons serão imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas até o laboratório, onde serão mantidas congeladas em freezer comum (-20°C), até o momento das análises. Nestas amostras, serão analisadas as concentrações de arsênio (As) e dos metais cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn). A sequência dos procedimentos necessários para obtenção das amostras encontra-se descrita abaixo:

- Coleta de Hemolinfa

A hemolinfa será colhida utilizando-se agulha (0,45 ou 0,75 mm) e seringa de insulina (1 mL). **IMPORTANTE:** Para análise de íons, a seringa será previamente lavada 3 vezes com Solução Anticoagulante para Hemolinfa de Crustáceos (0,45 M Cloreto de Sódio [NaCl]; 0,1 M Glicose [C₆H₁₂O₆]; 94 mM Citrato de Sódio [Na₃C₆H₅O₇.H₂O]; 26 mM Ácido Cítrico [C₆H₈O₇]; 7,85 mM EDTA dissódico [C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O]; pH 4,6). Em todos os casos, os materiais utilizados, como a seringa e o anticoagulante, serão mantidos gelados, a fim de evitar a coagulação da hemolinfa.

Para a coleta de hemolinfa em camarões, a seringa será inserida na membrana entre a região dorsal do cefalotórax e abdômen, tomando-se o cuidado para não coletar a água da cavidade

branquial (Figura 7). Para a coleta da hemolinfa em caranguejos, a agulha será inserida até a metade na abertura inalante no último ou penúltimo par de pereópodos (seio sanguíneo) e serão colhidos, no mínimo, 200 μ L de hemolinfa (Figura 8).

Figura 7. Imagem ilustrativa da coleta de hemolinfa em camarões. Fonte: Anieli C. Maraschi.



Figura 8. Imagem ilustrativa da coleta de hemolinfa em caranguejos. Fonte: Márcio Geihs.



A amostra de hemolinfa (mínimo 200 μ L) será coletada com auxílio de seringa apenas lavada na solução anticoagulante e será destinada para a análise das concentrações iônicas ($n = 6$). O sobrenadante (plasma) obtido a partir de centrifugação (Minicentrífuga Mylabor; 1 min; velocidade fixa de 4.656 g) será transferido para um criotubo de 2 mL e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido.

Após a centrifugação da hemolinfa e separação do plasma, o pellet será armazenado em criotubos de 2 mL ($n = 6$) em nitrogênio líquido para posterior análise de Sítios AP (danos no DNA), em laboratório. Neste caso, a coleta poderá ser feita sem ou com anticoagulante.

Para o Teste do Micronúcleo, a hemolinfa (mínimo 200 μL) será coletada com auxílio de seringa contendo anticoagulante (1:1). A amostra obtida será imediatamente centrifugada (Minicentrífuga Mylabor; 1 min; velocidade fixa de 4.656g). O sobrenadante será descartado e o pellet ressuspendido em 100 μL de solução anticoagulante para hemolinfa de crustáceos e homogeneizado suavemente. O homogeneizado (20 μL) será então adicionado às extremidades de uma lâmina com borda fosca. Com o auxílio de uma lamínula, será realizado o esfregaço para análise de micronúcleo. As lâminas com o esfregaço serão preparadas em triplicata e secas à temperatura ambiente (15-60 min). Após isso, as lâminas serão imersas em Metanol (PA) por 2 min, para fixação, e armazenadas em caixas para lâminas, até posterior coloração e análise em laboratório.

- Coleta de Tecidos

Para camarões, as brânquias dos lados direito e esquerdo dos espécimes serão cuidadosamente dissecadas com o auxílio de microtesoura e lupa (se estiver disponível). Para as espécies marinhas, todo o tecido branquial de cada indivíduo será destinado para as análises das concentrações de metais ($n = 6$) e para as análises de lipoperoxidação (LPO) ($n = 6$), o qual será armazenado em criotubo de 2 mL e imediatamente preservado em nitrogênio líquido. Para a espécie de camarão dulcícola e estuarina, todo o tecido branquial de cada indivíduo será destinado para a análise das concentrações de arsênio e metais ($n = 6$), análise de lipoperoxidação ($n = 6$) e atividade da Na^+/K^+ -ATPase ($n = 6$). O tecido branquial destinado à atividade da Na^+/K^+ -ATPase será imediatamente preservado em tampão SEI (1:10). Os criotubos (2 mL) contendo as brânquias, serão imediatamente armazenados em nitrogênio líquido.

Para as brânquias de caranguejos, os pereópodos serão segurados com uma mão e o cefalotórax será tracionado para cima até sua ruptura. As brânquias (anteriores e posteriores) de *U. cordatus* ($n = 6$), *C. guanhamu* ($n = 6$) e *O. quadrata* ($n = 6$) serão dissecadas e acondicionadas em tubos criogênicos, para posterior determinação laboratorial da lipoperoxidação (LPO).

Após a retirada da carapaça do cefalotórax dos camarões e caranguejos, o hepatopâncreas de cada indivíduo será dissecado, acondicionado em criotubo (2 mL) e destinado à análise das concentrações de arsênio e metais ($n = 6$). Uma porção do tecido hepatopancreático de outro indivíduo será coletada, acondicionada em criotubo (2 mL) e destinada à análise da concentração de metalotioneínas ($n = 6$), enquanto a outra porção será coletada, acondicionada em criotubo (2 mL) e destinada à análise da lipoperoxidação ($n = 6$). Todo o material será imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Após retirada da carapaça dos camarões, o músculo abdominal de um único indivíduo será coletado, acondicionado em criotubo (2 mL) e destinado à análise das concentrações de metais ($n =$

6). A amostra de músculo de um indivíduo será coletada, acondicionada em criotubo (2 mL) e destinada à análise da concentração de proteínas carboniladas (n = 6). Durante a coleta serão retirados o cordão nervoso ventral e o intestino do animal, antes de congelar o músculo. Nos caranguejos, o músculo do coxopodito do 2º ou 3º pares de pereópodos de ambos os lados será dissecado, sendo que a carapaça que circunda o coxopodito será rompida para a retirada dos músculos anteriores e posteriores, tomando-se o cuidado para não coletar os pigmentos junto com a amostra de músculo.

❖ Vertebrados

Todos os procedimentos que envolvem a captura e coleta de espécimes de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA-FURG) (certificado n° P036/2018).

❖ Girinos

A coleta de girinos de anfíbios será realizada nos 9 pontos de amostragem do Rio Doce no estado do Espírito Santo, através de arrastos com rede tipo WP- 2 de 60 cm de diâmetro de boca e malha de 200 µm. Após a captura, com auxílio de puçás, os animais serão eutanasiados em hidróclorido de benzocaína (500 mg/L). Para a análise das concentrações de arsênio e metais, serão coletados 5 pools de girinos de anfíbios com aproximadamente 0,5 g cada. Para a análise dos biomarcadores, serão coletados 5 pools adicionais, com as mesmas especificações descritas para as amostras destinadas à determinação das concentrações de metais. Todas as amostras (pools) serão armazenadas em criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

❖ Peixes

Para a amostragem nas drenagens com maior volume de água ao longo da porção capixaba do Rio Doce, serão utilizadas redes de-emalhar de diferentes malhas (15, 25, 35, 50 e 60 mm entre nós adjacentes), cada qual com 20 m de comprimento. Em cada ponto de amostragem, serão armados três conjuntos de redes, com redes de todas as malhas, ao final da tarde, sendo os mesmos retirados na manhã do dia seguinte, devendo, portanto, permanecer na coluna d'água por aproximadamente 12h. As coletas serão realizadas com o auxílio de pescadores profissionais locais, geralmente associados a colônias e associação de pescadores, com o apoio de barcos a remo e a motor.

Além das redes de-emalhar, serão utilizadas rede de arrasto, peneiras e tarrafa (malha 20 mm). As coletas serão realizadas sem esforço padronizado, possibilitando explorar todos os tipos de ambientes disponíveis (corredeiras, poços, locas, etc.) na área estudada, a fim de se obter o número amostral necessário de amostras para as análises das concentrações de arsênio e metais, bem como de biomarcadores. As peneiras serão posicionadas perpendicularmente ao substrato,

com a boca voltada para montante, sendo o substrato à sua frente revolvido com os pés e mãos, com o objetivo de desalojar os peixes, os quais serão conduzidos pela corrente para dentro da peneira.

Já a rede de arrasto será utilizada por duas pessoas, cada qual em uma extremidade, posicionando-a paralelamente à margem e percorrendo-se todo o espaço à sua frente, de tal forma que todos os peixes que se abrigavam na vegetação marginal ao alcance da rede sejam capturados. Os trechos serão percorridos de jusante a montante (contra o fluxo da água), para evitar a ressuspensão do sedimento, o que pode afugentar os peixes.

Para a coleta de peixes de interesse comercial nos pontos de amostragem localizados na foz do Rio Doce e região costeira adjacente, serão realizados arrastos de fundo, com auxílio de um barco arrasteiro que acompanhará o barco de pesquisa (Figura 9). Cada arrasto terá duração entre 15 a 30 min, utilizando-se redes com comprimento superior de 23 m, comprimento da tralha inferior de 16 m e comprimento total de 32 m. Em localidades com arrasto de fundo proibido (exemplo, Parque Nacional Marinho de Abrolhos), serão utilizadas outras artes de pesca (armadilhas, pargueiras, etc.).

Figura 9. Retirada de rede de pesca após arrasto no Navio de Pesquisa Soloncy Moura. Foto: Fernando Moraes.



Após a captura, os animais serão identificados, pesados (g), medidos (mm) e fotografados, sendo que um exemplar de cada espécie de interesse coletado será acondicionado em saco plástico contendo etiqueta com indicações de sua procedência, malha, data e identificação do coletor. Os peixes coletados para posterior confirmação taxonômica serão anestesiados (benzocaína diluída na água; 0,25 mg/L) e depois fixados em solução de formaldeído (10%), permanecendo nesta solução por um período de 48 h e depois então transferidos para uma solução de etanol (70%).

Para as análises das concentrações de arsênio e de metais, bem como dos biomarcadores, os espécimes de interesse, logo após a coleta, serão mantidos em caixas plásticas com água do próprio local com aeração, durante todo o período de amostragem. Após isso, serão anestesiados (benzocaína diluída em água; 0,25 mg/L), pesados (g) e medidos (mm). Após anestesia, os animais serão dissecados para a coleta de tecidos/órgãos, conforme descrito a seguir:

- Coleta de sangue

A colheita de sangue será realizada através de punção da veia caudal, utilizando-se seringa de insulina (1 mL), devidamente lavada com anticoagulante (heparina). A agulha será inserida próxima ao pedúnculo caudal, até alcançar a coluna vertebral (Figura 10) e se ter acesso ao vaso sanguíneo.

Figura 10. Localização da veia caudal para retirada de sangue em peixes. Fotos: Carlos E. D. Vieira.



Após a coleta das amostras de sangue total, estas serão acondicionadas em microtubos de 1,5 mL. Uma alíquota de 15 μ L do sangue de cada animal será dispensada em três lâminas de vidro, limpas e identificadas, para a confecção de esfregaços sanguíneos, para posterior análise de danos no DNA (Teste do Micronúcleo). As lâminas permanecerão secando durante a noite, em caixas próprias protegidas da luz e calor, e então fixadas em metanol absoluto por 10 min. O restante do sangue total será congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de danos oxidativos no DNA, com base na quantificação de sítios apurínicos/apirimídicos (AP).

Para a determinação das concentrações iônicas plasmáticas e biomarcadores de desregulação endócrina (vitelogenina e proteína da zona radiata), outras 6 amostras de sangue total serão

retiradas do grupo de peixes destinado à análise das concentrações de arsênio e metais ($n = 6$). Logo após a coleta, 5 μL de um coquetel inibidor de proteases (Sigma Aldrich®) será adicionado a cada 100 μL de amostra e estas serão então imediatamente centrifugadas em microcentrífugas portáteis (4.600 g, 2 min), para a separação do plasma sanguíneo, que por sua vez será coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Após a coleta de sangue, os peixes serão eutanasiados, através da superexposição ao hidrocloreto de benzocaína (500 mg/L).

- Coleta de tecidos:

Após a coleta de sangue, as brânquias serão cuidadosamente dissecadas da cavidade opercular, evitando-se ao máximo tocar os filamentos branquiais com a pinça e tesoura. Os arcos branquiais serão separados em placas de Petri contendo solução fisiológica para peixes (Figura 11). O segundo arco branquial direito será lavado delicadamente com pincel macio e solução fisiológica, para a retirada do excesso de sangue e muco. Após isso, será então fixado em solução de Bouïn (6-8 h) para posterior análise morfológica. Após o período de fixação, a solução fixadora será substituída por álcool 70%, o qual será trocado diariamente, até a completa remoção do excesso de fixador. Os arcos branquiais restantes serão acondicionados em criotubos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

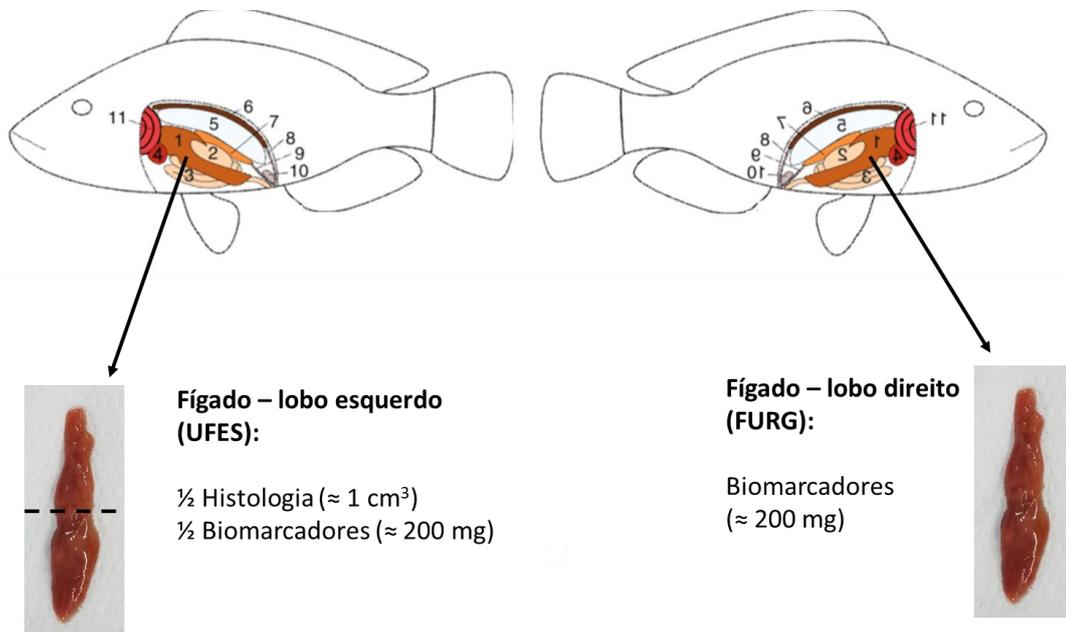
Figura 11. Imagem ilustrativa da coleta de brânquias em peixes. Foto: Carlos E. D.Vieira



Após a dissecação das brânquias, a cavidade abdominal dos peixes será exposta, utilizando-se uma tesoura. Deverá ser observada a presença de gônadas masculinas ou femininas, de acordo com o estágio de desenvolvimento reprodutivo dos indivíduos. O sexo dos exemplares será anotado em planilha. A seguir, o fígado dos peixes será dissecado com o auxílio de pinças curvas, tentando-se remover os lobos hepáticos da forma mais íntegra possível. O órgão será dividido (Figura 12) para as análises histológicas e de biomarcadores. Para as análises histológicas, o órgão será fixado em solução de Bouïn (6-8 h) e posteriormente conservado em álcool 70%. Para a avaliação dos

biomarcadores bioquímicos, as amostras serão acondicionadas em criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

Figura 12. Representação esquemática da separação do fígado para análises de biomarcadores.



Por fim, uma amostra de músculo da região dorsal (musculatura hipoaxial) será dissecada conforme mostrado na imagem abaixo, removendo-se as escamas e a pele (Figura 13). As porções de músculo serão acondicionadas em criotubos e estes congelados em nitrogênio líquido. Após a dissecação dos animais em campo, a carcaça será descartada no local de coleta (campo).

Figura 13. Imagem ilustrativa da coleta de músculo em peixes. Foto: Carlos E. D.Vieira



❖ Aves

Ao longo do monitoramento ambiental também serão coletadas amostras de aves. Entretanto, devido à grande heterogeneidade ambiental ao longo do curso do rio afetado pelo evento, não será possível antever quais espécies estarão presentes nas três áreas amostrais (estuário, manguezal e região costeira) e, portanto, definir a amostragem em nível específico. Por isso, serão realizadas coletas de espécies de aves que representem os hábitos alimentares relacionados aos ambientes dulcícola e estuarino. Assim, em cada uma das áreas amostrais, será coletada uma espécie de cada grupo alimentar (Quadro 5), conforme a sua abundância local e buscando se atender à lista de priorização associada. As espécies que serão capturadas em cada local de amostragem serão selecionadas com base em dados de abundância, priorizando sempre as mais abundantes, a fim de que a coleta não resulte em impactos populacionais e que viabilize a obtenção de amostras das mesmas espécies ao longo de todo o período de monitoramento.

Quadro 5. Lista das famílias de aves estuarinas, de manguezais e da região costeira a serem amostradas no monitoramento de contaminantes, com seu respectivo hábito alimentar e exemplo de espécies a serem priorizadas quando presentes na área amostral.

| Hábito alimentar/guilda trófica | Famílias | Exemplo de espécies a serem priorizadas |
|---|--|--|
| Invertebrados aquáticos, ovos e larvas de anfíbios, pequenos vertebrados e de origem vegetal. | Anseridae, Rallidae, Charadriidae, Scolopacidae. | Charadrius collaris, Actitis macularius, Aramides saracura, Gallinula galeata. |
| Filtradores, plantas aquáticas e invertebrados | Anatidae | Dendrocygna autumnalis, Dendrocygna viduata, Amazonetta brasiliensis. |
| Peixes e invertebrados aquáticos | Podicipedidae, Ardeidae, Cerylidae. | Egretta carerulea, Egretta thula, Chloroceryle americana. |
| Piscívoras | Phalacrocoracidae, Sternidae, Rychopidae, Alcedinidae. | Phaetuza simplex, Rynchops niger. |
| Malacófagos | Acciptridae, Aramidae | Rostrhamus Sociabilis. |

Serão obtidas amostras de, no mínimo, dois indivíduos da mesma espécie por área de amostragem, por estação do ano (inverno e verão). Será priorizada a amostragem não letal, por captura manual ou com rede-de-neblina, ou amostragem de indivíduos encontrados mortos. Serão realizadas amostragens com redes-de-neblina nos diferentes ambientes das áreas pré-definidas, fazendo uso de uma linha de 10 redes de 12 m ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados, visando à obtenção não letal de amostras em 10 indivíduos/área amostral/estação do ano (inverno e verão).

No caso das aves, os animais serão capturados nos ninhos ou áreas de alimentação nos diferentes ambientes das áreas pré-definidas. As coletas serão realizadas o com auxílio de redes-de-neblina, fazendo-se uso de uma linha de 10 redes de 12 m, ao longo de dois dias/noites consecutivos ou alternados. Serão colocadas no máximo 10 redes simultaneamente, com 3 pesquisadores revisando-as em intervalos de 30 min. As redes não serão dispostas ao sol, para evitar estresse térmico nas aves, e serão fechadas quando houver perspectiva de chuva ou vento forte. Dependendo do grupo de aves de interesse, as redes serão colocadas à noite. Haverá sempre pelo menos um anilhador sênior acompanhando as atividades de captura e amostragem de aves vivas. Após a captura, as aves serão removidas cuidadosamente até a área adjacente, onde serão imobilizadas para evitar fraturas e também ataques ao pesquisador. A contenção do animal será manual. Após a coleta de sangue e penas, a ave será liberada no ninho onde foi capturada. Esse procedimento durará menos de 10 min. As aves que não puderem ser capturadas pelas redes-de-neblina, serão abatidas em ambiente aberto, utilizando-se arma de pressão. Em caso de ausência da guilda trófica/hábito alimentar pré-definida, a mesma será devidamente justificada com base em bibliografia especializada e em dados de abundância. A amostragem, tanto letal quanto com redes-de-neblina, será interrompida tão logo o número mínimo de indivíduos necessário tenha sido atingido. Será sempre priorizada a amostragem de aves vivas, relegando a amostragem letal somente aos casos em que a captura não for possível, sendo que nestes casos, se abaterá espécies comuns e sem problemas de conservação.

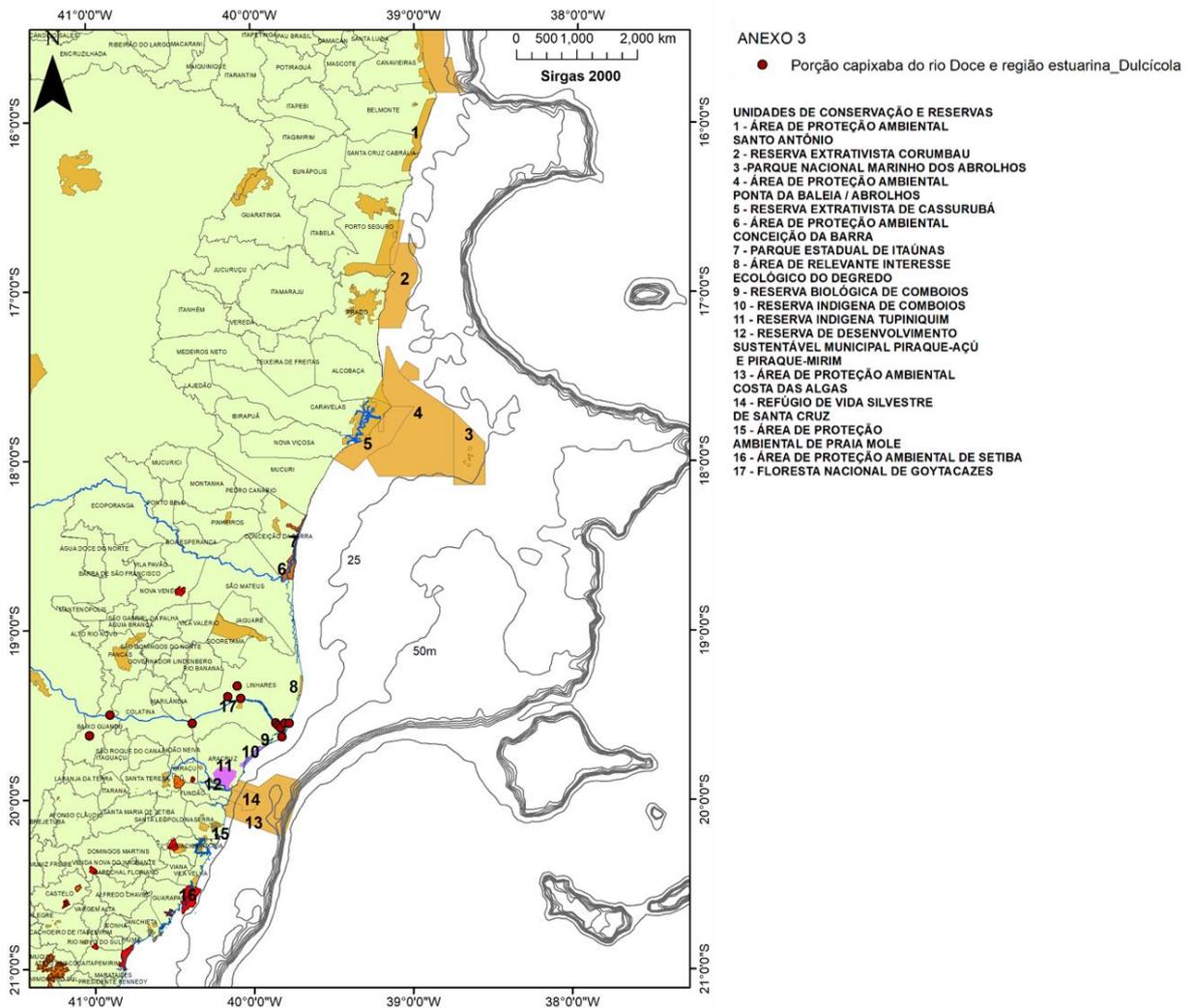
Na coleta das aves, não serão utilizados anestésicos para a coleta de sangue e penas, uma vez que os procedimentos não causam danos ou dor aos animais. As penas são removidas individualmente, em locais diversos, assim não deixando nenhuma área descoberta da ave. Isso facilita a recuperação do animal (que fica rapidamente apto para suas atividades cotidianas) e evita a injeção de alguma substância que possa afetar sua saúde ou causar alguma alergia. Durante a recuperação de uma eventual anestesia, a ave poderá estar sujeita à predação. Neste caso, a coleta sem utilização de anestesia promover uma recuperação mais rápida do animal. Além disso, será realizada a coleta de sangue para análise de isótopos estáveis. A injeção de substâncias anestésicas poderia afetar os resultados das análises, já que contém carbono e eventualmente nitrogênio na composição. Sendo assim, os procedimentos não letais serão realizados o mais rápido possível e visando o bem-estar do animal, após serem novamente liberados (Bugoni et al., 2008; Bugoni & Furness, 2009; Leal et al., 2017) da barragem de mariana (MG) em regiões dulcícolas, estuarinas e marinhas

5.2 ANEXO 3. MONITORAMENTO AMBIENTAL NO RIO DOCE, ÁREA ESTUARINA E MARINHA SISTEMA AQUÁTICO DULCÍCOLA

A malha amostral do sistema aquático dulcícola (rios e lagos) e estuarino é composta por 12 estações, sendo 4 na calha fluvial do rio Doce, 1 em rio tributário (rio Guandu) e 7 em ecossistemas

lacustres (Figura 14 e Quadro 6) Esse arranjo espacial foi aprovado na Reunião da Câmara Técnica de Biodiversidade – CTBio de 18/07/2018. Foi incluída a estação à jusante da Usina Hidrelétrica - UHE de Mascarenhas, a qual servirá como referência para avaliação das condições geoquímicas da água do rio Doce após o último represamento em sua calha. As estações dos lagos Nova, Juparanã e Limão foram reposicionadas a fim de localizar a amostragem de água e sedimento em regiões com maior profundidade, o que favorece o processo de sedimentação e restringe a ressuspensão. Foi incluída a estação amostral na lagoa Monsarás devido à influência marinha nesse ecossistema.

Figura 14. Malha amostral dos ecossistemas aquáticos dulcícolas.



Quadro 6 . Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do monitoramento dos ecossistemas aquáticos continentais (Anexo 3).

| Estação Amostr al | Local | Sistema | Coordenadas UTM | | Coordenadas Geográficas | | Obs. |
|-------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------------|
| | | | Northing | Easting | Latitude | Longitude | |
| 17 | rio Guandu | fluvial tributário | 7828800,21 | 288391,72 | -19,62467 | -41,01786 | Amostragem completa (1 prof.) |
| 21 | rio Doce | calha rio Doce | 7853303,85 | 387184,71 | -19,41136 | -40,07450 | Amostragem completa (2 prof.) |
| 22 | rio Doce | calha rio Doce | 7837362,97 | 410065,52 | -19,55656 | -39,85735 | Amostragem completa (2 prof.) |
| 23 | Lagoa do Areão | lagoa | 7835704,36 | 411560,58 | -19,57162 | -39,84318 | Amostragem completa (1 prof.) |
| 24 | Lagoa do Areal | lagoa | 7834124,45 | 413143,12 | -19,58596 | -39,82816 | Amostragem completa (1 prof.) |
| 25 | Lagoa Monsarás | lagoa | 7837160,79 | 415913,62 | -19,55865 | -39,80161 | Amostragem completa (1 prof.) |
| 25a | Lagoa Monsarás (estação nova) | lagoa | 7837139,22 | 418868,44 | -19,55896 | -39,77345 | Amostragem completa (1 prof.) |
| 26 | Foz do rio Doce | calha rio Doce | 7828233,84 | 414080,55 | -19,63923 | -39,81950 | Amostragem completa (2 prof.) |
| 18 | Lago do Limão (reposicionada) | lago | 7836909,17 | 355432,1 | -19,55744 | -40,37812 | Amostragem completa (3 prof.) |
| 0 | Jusante da UHE Mascarenhas | calha rio Doce | 7842496,39 | 301714,69 | -19,50234 | -40,88942 | Amostragem completa (2 prof.) |
| 19 | Lago Nova (reposicionada) | lago | 7854566,84 | 378711,07 | -19,39945 | -40,15511 | Amostragem completa (3 prof.) |
| 20 | Lago Juparanã (reposicionada) | lago | 7861435,44 | 384935,41 | -19,33776 | -40,09543 | Amostragem completa (3 prof.) |
| P04 | P04 do Anexo 7 | calha rio | 7848549,0 | 402951,26 | - | - | Vazão e |

| | | | | | | | |
|--|--|------|---|--|----------|----------|-----------------|
| | | Doce | 7 | | 19,45515 | 39,92459 | MPS (perfil) |
|--|--|------|---|--|----------|----------|-----------------|

A relação dos parâmetros a serem monitorados é apresentada no Quadro 7. As amostragens serão mensais para as matrizes coluna d'água e sedimentos superficiais e anual para matriz testemunho de sedimento. As coletas de água na calha dos rios Doce e Guandu serão realizadas em subsuperfície (0 a 15 cm) e no fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). Devido ao efeito de turbulência e mistura da coluna d'água pela vazão fluvial e pelo vento, nas lagoas costeiras (<3,0m de profundidade máxima) as coletas de águas serão feitas em meia profundidade. Já nos lagos profundos as amostragens serão realizadas em subsuperfície (0 a 15 cm), na profundidade de 1% de radiação fotossinteticamente ativa e no fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). Vale salientar que nas estações amostrais fluviais, as amostragens de água serão realizadas com uma garrafa de Ninskin (horizontal), enquanto que nas estações amostrais lacustres, com uma garrafa de Van Dorn (vertical).

Quadro 7. Relação dos parâmetros físicos, físico-químicos e hidrobiológicos do monitoramento dos ecossistemas aquáticos continentais.

| Parâmetros Físicos | Parâmetros físico-químicos e hidroquímicos | Parâmetros hidrobiológicos |
|--|--|---|
| <u>MATRIZ COLUNA D'ÁGUA</u> | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Vazão • Temperatura • Turbidez • Material particulado em suspensão • Granulometria do MPS <ul style="list-style-type: none"> • Nível d'água • Correntes | <ul style="list-style-type: none"> • Salinidade • Condutividade elétrica • Oxigênio dissolvido • Alcalinidade • Predox • Metais • Nutrientes (N, P e Si) • Compostos orgânicos • Isótopos estáveis (particulado) • Elementar (particulado) | <ul style="list-style-type: none"> • Clorofila a • Fitoplâncton • Zooplâncton • Macrófitas • Perifíton |
| <u>MATRIZ SEDIMENTO SUPERFICIAL</u> | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria | <ul style="list-style-type: none"> • Matéria orgânica <ul style="list-style-type: none"> • Densidade • Mineralogia • Compostos orgânicos <ul style="list-style-type: none"> • Nutrientes (P) <ul style="list-style-type: none"> • Metais • Hidrocarbonetos • Isótopos estáveis (particulado) • Elementar (particulado) | |
| <u>MATRIZ SEDIMENTO TESTEMUNHO</u> | | |

| | | |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria | <ul style="list-style-type: none"> • Matéria orgânica • Nutrientes (P) • Metais | |
|---|--|--|

5.2.1 Matriz coluna d'água

❖ Vazão fluvial e Correntes

Medições de vazão e correntes do rio Doce serão realizadas nas estações localizadas em Linhares (estação 21), P04 Anexo 7 (estação 0), estação 22 e na foz do rio Doce (estação 26) (Figura 14). As medições serão realizadas com ADCP, acoplado à embarcação, para realização de transectos. A velocidade da embarcação deverá ser adequada de forma a garantir a qualidade dos dados. Em cada seção serão feitas duas transversais, de margem a margem. No início e no final de cada transecto deverá ser anotada a leitura da régua limnimétrica, instalada nas seções de medição. Os dados serão processados no software WinRiver II da RD Instruments.

❖ Material Particulado em Suspensão

Nas estações 21 e 22 serão coletadas amostras de água-sedimentos. As amostras serão obtidas pelo método Igual Incremento de Largura, com uso de amostrador de sedimentos de integração na vertical. As amostragens serão feitas em, ao menos 12 verticais, nas quais o amostrador deverá ser submerso e içado com velocidade de trânsito igual em todas as verticais. As amostras coletadas serão acondicionadas em galões plásticos, formando uma amostra composta de água-sedimentos, representativa das condições da seção no momento da medição. As amostras serão identificadas e armazenadas ao abrigo de luz e calor, sendo encaminhadas para laboratório LABHIDRO, para análises de concentração e granulometria de sedimentos em suspensão.

Em laboratório, as amostras serão pesadas e peneiradas na peneira de nº 230 para a separação do material fino e remoção da areia, onde o passante é armazenado em becker de 2L. Em seguida, adiciona-se Sulfato de Cobre e coloca-os para decantar por 48 horas. Em seguida, serão realizadas as análises de sólidos dissolvidos, retirando-se três amostras de 50 mL da parte sobrenadante dos beckers que estarão decantando e, após 48 h, será feita a redução do volume para 900 mL e a análise de sólidos suspensos, filtrando-se 25 mL em membrana com porosidade de 45 µm e 47 mm de diâmetro. Tanto as amostras de sólidos dissolvidos quanto as de sólidos suspensos serão secas em estufa à 105 °C por 24 horas. Em seguida, os conteúdos dos beckers serão adicionados nos tubos graduados até a marca de 100 cm e com posterior retiradas de alíquotas de 10 em 10 cm nos tempos de 0,5, 1, 2, 5, 13, 32, 80, 160, 450 e 461 min. Para cada retirada, será realizada a leitura da temperatura da água. As amostras retiradas serão secas em estufa à 105 °C por 24 horas e em seguida pesadas individualmente. Após esse processo serão traçadas as curvas de Oden para obtenção das porcentagens granulométricas.

❖ Salinidade

Na seção localizada na foz do rio Doce (estação 26) serão feitas perfilagens de salinidade, com uso de sonda multiparâmetros, e será acompanhada a intrusão salina até seu limite de montante. As medidas serão feitas continuamente, a partir da embarcação. Os dados serão tabulados e apresentados em mapas.

❖ Nível d'água

Serão instalados sensores de pressão nas estações localizadas em Linhares (estação 21), P04 Anexo 7 (estação 0), estação 22 e na foz do rio Doce (estação 26) (Figura 14), com finalidade de acompanhamento de níveis d'água. Os registros serão feitos a cada 5 minutos e armazenados em datalogger. Os dados serão coletados mensalmente, por ocasião das campanhas de monitoramento. Nestas ocasiões será verificada a qualidade das leituras armazenadas, comparando com as leituras obtidas nas réguas limnimétricas instaladas junto aos sensores de pressão. Os dados serão tabulados e apresentados em gráficos temporais.

❖ Parâmetros físico-químicos

Nas estações amostrais fluviais, cada amostra será transferida para um balde, dentro do qual serão mensurados, com a utilização de uma sonda multiparâmetro Horiba U-53, os parâmetros temperatura (°C), turbidez (UNT), sólidos totais dissolvidos (mg.L^{-1}), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH, potencial de oxirredução - ORP (mV) e condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$).

Em cada estação amostral lacustre, serão realizados perfis de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH, potencial de oxirredução - ORP (mV), condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$), ficocianina (células.mL^{-1}), clorofila a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e turbidez (UNT) com uma sonda multiparâmetros do tipo Horiba U-53 ou Exo2, sendo o registro de dados realizado a cada metro de profundidade. Em cada estação amostral deverá ser medida a profundidade do disco de Secchi (10% da radiação fotossinteticamente ativa), a partir da qual será determinada a profundidade de 1% da radiação fotossinteticamente ativa (zona eufótica).

❖ Alcalinidade

Serão coletados 500mL de água, acondicionados em frascos de polipropileno e que serão refrigerados para posterior determinação em laboratório. Em laboratório a alcalinidade será determinada por meio de titulação.

❖ Nutrientes

Serão coletados 125mL de água para análise dos nutrientes totais (fósforo e nitrogênio), acondicionados em frascos de polipropileno e que serão refrigerados para posterior determinação em laboratório. Para as frações dissolvidas (nitrito, nitrato, amônia, orto-fosfato e silicato) será utilizado o volume de amostra filtrado para MPS. Essas amostras deverão ser acondicionadas, separadamente, em 5 frascos de polipropileno de 60mL e congeladas para posterior análise em

laboratório. Em laboratório a concentração dos nutrientes será determinada por espectrofotometria (APHA, 2005).

❖ Hidrobiológicos (clorofila a e feopigmentos - pigmentos fotossintetizantes)

Serão coletados 500mL de água, acondicionados em frascos de polipropileno e que será refrigerado, em local abrigado da luz, para posterior determinação em laboratório. Será realizada, em laboratório, filtração com filtro de fibra de vidro de 47mm de diâmetro e porosidade média de 0,7 μ m e a determinação de clorofila a e feopigmentos será através de espectrofotometria, por meio da extração em acetona 90%.

❖ Compostos orgânicos

- Hidrocarbonetos (F1), Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (F2), Biomarcadores Lipídicos (F3), Fenóis, Pesticidas, PCB, Éter-aminas e Aminas aromáticas.

Serão coletados um total de 5000 mL de água em frascos de vidro âmbar de 1000 mL com batoque de teflon, adicionando previamente 1 mL de metanol para inibição de atividade microbiana. Desse total coletado, 1000 mL irá para determinação de hidrocarbonetos alifáticos (F1), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (F2) e biomarcadores lipídicos (F3); 1000 mL para pesticidas, 1000 mL para PCBs e 1000 mL para fenóis e 1000 mL para Éter-aminas e Aminas aromáticas. As amostras serão pré-processadas por filtração simples para remoção dos sólidos em suspensão. Após a filtração, os frascos âmbar (pré-lavados com água destilada e HNO₃ 10%) com as amostras pré-processadas deverão ser mantidos refrigerados (4°C) e no escuro em até posterior análise em laboratório.

- Ácidos Graxos (F4) e Lipídeos Totais

Serão coletados 1000mL da amostra de água para análise de ácidos graxos e lipídeos totais. As amostras de água serão filtradas em filtros de fibra de vidro GF-F de 47mm de diâmetro e porosidade média de 0,7 μ m, pré-incinerados a 450°C por 2h (até a completa saturação do filtro, anotando-se o volume filtrado) e previamente pesados. Após a filtração, o material deverá ser congelado e liofilizado. Após liofilização o filtro deverá ser novamente pesado para registro da quantidade de material coletado (g) sobre o filtro. As amostras filtradas e liofilizadas ficarão acondicionadas a -20°C até análise. Todas as amostras serão liofilizadas antes da análise. Para as análises de lipídeos totais e ácidos graxos, os filtros contendo as amostras, assim como as amostras de sedimento, serão submetidos a homogeneização por sonicação de 5 a 10 minutos a 5000 ciclos min⁻¹ e posterior extração em solução de clorofórmio–metanol 2:1 v:v. A análise de lipídeos totais será realizada pelo método espectrofotométrico da Fosfovanilina (Zöllner e Kirsch, 1962; Ahlgreen e Merino 1991). Será utilizada uma curva padrão de colesterol e a leitura será feita a 528nm. Para a quantificação dos ácidos graxos, após a extração será adicionado o padrão interno (ácido tricosanóico, 0,2 mg mL⁻¹) e as amostras serão secas sob fluxo de nitrogênio e imediatamente analisadas. A análise se dá pela formação dos metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) com a adição de ácido sulfúrico 5% v:v e o aquecimento das amostras a 80°C por 4 hs.

Uma alíquota de 0.2 μL é injetada em uma coluna capilar (Omegawax 320, Supelco 60m x 0.32 mm, ou similar) em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent, Alemanha). A identificação dos ácidos graxos se dá por comparação dos tempos de retenção do espectro obtido para as amostras analisadas com o espectro de uma solução padrão de ácidos graxos de concentração conhecida (FAME Mix, Supelco) e confirmada por comparação do espectro de massa obtido em modo full scan com aqueles presentes em uma biblioteca de espectros (Nist). A quantificação se dá por meio de curvas de calibração para cada ácido graxo encontrado, tendo por base as soluções padrão previamente analisadas e quantificadas.

❖ Metais

- Metais Totais

Em cada ponto amostral serão coletadas amostras de água com auxílio de garrafa horizontal nas profundidades de superfície - S (0 a 15 cm) e fundo - F (cerca de 50 cm acima do fundo). Todos os frascos utilizados deverão ser de polipropileno, previamente higienizados, e todas as amostras deverão ser mantidas refrigeradas a 4 °C até o momento da análise.

Para análise de metais totais de verão ser coletados 500 mL da amostra (F e S) em frasco contendo gotas de ácido nítrico, previamente adicionadas. Para análise de materiais particulados em suspensão (MPS) deverão ser coletados 2L de água (F e S) que serão filtrados com auxílio de membrana de acetato de celulose (porosidade 0,45 μm e diâmetro 47 mm) que será posteriormente analisada. O volume filtrado poderá ser inferior a 2 L, caso haja a saturação da membrana. Para análise de metais dissolvidos, deverá ser separada uma amostra de 500 mL desta água filtrada (fundo e superfície) e transferida para um frasco plástico, contendo gotas de ácido nítrico.

- Mercúrio

Os mesmos procedimentos de coletas descritos anteriormente deverão ser repetidos para análise de mercúrio, ajustando-se os volumes, ou seja: a) para análise de mercúrio total serão coletados 500 ml de água (F e S). Será recolhida amostra de 1 litro de água (F e S) para filtração, conforme explicitado acima gerando a membrana para análise de mercúrio em material particulado (F e S) além de 500 ml de amostra de água filtrada (F e S) para análise do teor de mercúrio dissolvido.

❖ Elementar (particulado)

- Carbono, Nitrogênio e Enxofre

Amostras de água serão coletadas em frascos de polipropileno (2000mL) previamente descontaminados com HCL e lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e filtradas (até a completa saturação do filtro, anotando-se o volume filtrado) em filtros de fibra de vidro GF-F (0,7 μm) de 47 mm, pré-incinerados a 450°C por 2h, e previamente pesados. Após a filtração o material deverá ser congelado e liofilizado. Após liofilização o filtro deverá ser novamente pesado para registro da quantidade de

material coletado (g) sobre o filtro. O material filtrado e liofilizado ficará acondicionado a -20oC até análise. Antes da análise os filtros serão transferidos em capsulas de estanho e fechadas utilizando uma prensa. A análise elementar de carbono e nitrogênio nas amostras de seston será realizada por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha). Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão preparados para terem concentrações similares às amostras analisadas. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises. Os resultados serão apresentados como porcentagem de carbono e nitrogênio nas amostras.

❖ Isótopos (particulado)

• Carbono e Nitrogênio

Amostras de água serão coletadas em frascos de polipropileno (2000mL) previamente descontaminados com HCL e lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e filtradas (até a completa saturação do filtro, anotando-se o volume filtrado) em filtros de fibra de vidro GF-F (0.7 µm) de 47 mm, pré-incinerados a 450oC por 2h, e previamente pesados. Após a filtração o material deverá ser congelado e liofilizado. Após liofilização o filtro deverá ser novamente pesado para registro da quantidade de material coletado (g) sobre o filtro. O material filtrado e liofilizado ficará acondicionado a -20oC até análise. Antes da análise os filtros serão transferidos em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa. As análises das razões isotópicas de carbono (C) e nitrogênio (N) nas amostras de seston serão realizadas com um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer – IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, onde X é ¹³C ou ¹⁵N e R é a razão correspondente ¹³C/¹²C ou ¹⁵N/¹⁴N. Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição isotópica similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizados serão p.ex. IAEA-CH3 (Celulose), IAEA-600 (cafeína), IAEA N2 (sulfato de amônio) e IAEA-NO3 (nitrato de potássio). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no calcário de Viena Pee Dee Belemnite (V – PDB) para o C e nitrogênio atmosférico, N₂, para o N. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas.

5.2.2 Matriz sedimento superficial

❖ Aspectos físicos (Granulometria e Mineralogia)

Para determinação da granulometria e mineralogia, amostras serão coletadas com o amostrador do tipo busca fundo Van Veen. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátulas de metal ou plástico, acondicionadas em sacos plásticos (coletar 3/4 do saco plástico) e refrigeradas para posterior determinação em laboratório (Limnolab-UFES). O sedimento não pode ter tido contato com o metal da draga (coletar sedimento do meio). A separação das frações fina (silte + argila) e grossa (areia + cascalho) é feita via úmida em 2 peneiras de 0,063 μ m sobrepostas. A separação a seco, por peneiramento, é realizada para a fração grossa (areia + cascalho).

Especificamente para as estações 21 e 22, as coletas de amostras de sedimentos de leito serão feitas mensalmente, com uso de draga, em seis pontos igualmente espaçados, ao longo da seção de medição de material particulado em suspensão, fora de locais de águas paradas. A quantidade mínima de amostra é 1 kg, igualmente distribuída nos pontos de amostragem. As amostras serão armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificadas e encaminhadas para o laboratório Labhidro-UFES, para determinação granulométrica.

❖ Parâmetros físico-químicos (pH e Predox)

A medição do pH e do potencial redox no sedimento será realizada a partir de um pHmetro de solo com o sedimento ainda na draga. O acesso ao sedimento será feito por meio da tampa da parte superior da draga.

❖ Matéria orgânica

Para determinação da matéria orgânica no sedimento, amostras serão coletadas com o amostrador do tipo busca fundo Van Veen. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátulas de metal, acondicionadas em marmitas de alumínio e refrigeradas para determinação em laboratório.

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

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

❖ Nutrientes (Orto-fosfato em água intersticial e Fósforo Total)

Para determinação de orto-fosfato em água intersticial e de fósforo total no sedimento, amostras serão coletadas com o amostrador do tipo busca fundo Van Veen. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátulas de polietileno e acondicionadas em potes plásticos e refrigeradas para posterior determinação em laboratório. Em laboratório a concentração dos nutrientes será determinada por espectrofotometria.

❖ Metais

• Metais totais e Terras raras

A coleta de sedimento de fundo será realizada com box corer ou busca fundo Van Veen. Deverá ser utilizada uma espátula de plástico para raspagem dos centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. A amostra deverá ter no mínimo cerca de 200g e deverá ser armazenada em pote plástico, devidamente identificado. Posteriormente, o sedimento deverá ser liofilizado e enviado para procedimentos de abertura e análises de metais totais, frações, terras raras e mercúrio.

• Mercúrio

Deverá ser usado parte de sedimento liofilizado, obtido através de coleta de sedimentos.

❖ Compostos orgânicos

• Hidrocarbonetos (F1), Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (F2), Biomarcadores Lipídicos (F3), Fenóis, Pesticidas, PCBs, Éter-aminas e Aminas aromáticas

Serão coletados um total de 1000g de sedimento com amostrador do tipo busca fundo (Van Veen) em marmitas de alumínio hermeticamente fechadas. Desse total coletado, 200g irão para determinação de hidrocarbonetos alifáticos (F1), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (F2) e biomarcadores lipídicos (F3); 200g para pesticidas; 200g para PCBs; 200g para fenóis e 200g para Éter-aminas e Aminas aromáticas. As amostras deverão ser preservadas sob refrigeração a 4 °C até seu pré-processamento. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátula de metal raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. As amostras serão liofilizadas, armazenadas em potes de alumínio ou vidro (calcinado), devendo conter, no mínimo, 10g de amostra seca, que, posteriormente serão congeladas e enviadas para o laboratório de análise.

• Ácidos Graxos e Lipídeos Totais

Para determinação de ácidos graxos e lipídeos totais no sedimento, amostras serão coletadas com o amostrador do tipo busca fundo Van Veen. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátulas de metal e acondicionadas em marmita de alumínio (completamente preenchida de sedimento) e refrigeradas para posterior determinação em laboratório. O sedimento não pode ter

tido contato com o metal da draga (coletar sedimento do meio). As amostras de sedimento deverão ser secas em estufa a 30°C (não ultrapassando 40°C), liofilizadas e acondicionadas em tubos eppendorf a -20°C até análise. Todas as amostras serão liofilizadas antes da análise.

❖ Elementar (particulado)

- Carbono

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa. A análise elementar de carbono nas amostras de sedimento será realizada por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha). Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão preparados para terem concentrações similares às amostras analisadas. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises. Os resultados serão apresentados como porcentagem de carbono nas amostras.

- Nitrogênio

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa.

A análise elementar de nitrogênio nas amostras de sedimento será realizada por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha). Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão preparados para terem concentrações similares às amostras analisadas. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises. Os resultados serão apresentados como porcentagem de nitrogênio nas amostras.

- Enxofre

As amostras de sedimento serão depositadas em uma cela de polietileno específica para análises por XRF, cuja base é montada com um filme de politerftalato (ou Mylar®) bem esticado, a fim de se ter uma distribuição homogênea do feixe de raios-X incidente para, então, serem submetidas à irradiação, em duplicata, usando um equipamento comum EDXRF de bancada (modelo EDX700 da

Shimadzu), equipado com um tubo de raios-X de ródio (Rh) metálico. As condições gerais de irradiação foram 10 mm de colimação do feixe incidente

❖ Isótopos (particulado)

• Carbono

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa.

As análises das razões isotópicas de carbono (C) nas amostras de seston serão realizadas com um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer – IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição isotópica similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizado serão p.ex. IAEA–CH3 (Celulose), IAEA-600 (cafeína). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no calcário de Viena Pee Dee Belemnite (V – PDB). Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas.

• Nitrogênio

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa.

As análises das razões isotópicas de nitrogênio (N) nas amostras de seston serão realizadas com um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer – IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{15}N e R é a razão correspondente $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição isotópica similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizado serão p.ex. IAEA N2 (sulfato de amônio) e IAEA-NO3 (nitrato de potássio). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no nitrogênio atmosférico, N2. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas.

5.2.3 Matriz sedimento testemunho

A coleta do testemunho de sedimento lacustre será feita anualmente com amostrador Uwitec hammer corer com tubos de 120 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro. Será coletado um único testemunho em cada ecossistema lacustre. As amostras serão coletadas nas estações amostrais previstas para as matrizes coluna d'água e sedimento. Os testemunhos de sedimento serão selados com tampões para transporte até o laboratório onde serão fatiados a cada 1 cm até 15 cm, em 2 cm até 25 cm e a cada 5 cm até o final. O acondicionamento das amostras será feito em potes de polietileno com tampa e volume de 250 mL. Cada amostra será identificada em relação a estação amostral, data e profundidade do core. Alíquotas das amostras serão posteriormente encaminhadas para análises de granulometria, matéria orgânica, nutrientes e metais totais.

As metodologias de coleta para as análises realizadas (Granulometria, Mineralogia, Matéria orgânica, Metais e Nutrientes) seguem o mesmo padrão adotado em 5.2.2 Matriz sedimento superficial.

5.2.4 Matriz biota

❖ Fitoplâncton

Em cada estação amostral da calha do rio serão feitas duas amostragens de água nas profundidades sub-superfície (0 a 15 cm) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). Para amostras quantitativas (Figura 16) a coleta será realizada através de passagem manual de frasco, na sub-superfície e com uma garrafa de Ninskin (horizontal) para a profundidade fundo, ambas as amostras serão fixadas com solução de lugol acético 5% e acondicionadas em frasco âmbar. As amostras para análise qualitativa da comunidade fitoplanctônica serão coletadas com rede de plâncton com abertura de malha de 20µm (Figura 15) através de arrastos horizontais na subsuperfície da coluna d'água. As amostras das demais profundidades serão coletadas com a mesma Garrafa (por cinco vezes filtrando um total de 10L) e imediatamente filtradas na rede de plâncton para que se proceda a concentração da amostra e serão acondicionadas em frascos de polietileno. Parte de cada amostra será mantida viva, para observação de algumas características fundamentais para identificação dos organismos, que só são visualizadas em organismos vivos, como tipo de movimento e coloração, e parte será fixada com solução formalina 4% para posterior análise em laboratório. No rio tributário e lagos rasos, a mesma forma de coleta, preservação e acondicionamento das amostras será realizada, porém apenas para meia profundidade. Já nos lagos profundos o procedimento se mantém, para as profundidades avaliadas: subsuperfície, 1% de luz e próximo ao fundo.

Figura 15: Arrasto de rede de fitoplâncton na lagoa Nova.



Figura 16: Amostras quantitativa (esquerda) e qualitativa (direita) da lagoa Nova.



- Análise qualitativa

Em laboratório, a análise qualitativa será realizada a partir de amostras vivas e fixadas coletadas com a rede de fitoplâncton, utilizando-se microscópio óptico, equipado com captura de imagem.

Os táxons serão esquematizados, medidos e identificados, utilizando-se bibliografia especializada e consulta aos diversos especialistas, visando a identificação ao nível específico, sempre que possível. A riqueza de táxons será determinada através do número de táxons presentes nas amostras.

- Análise quantitativa

A análise quantitativa será realizada a partir de amostras fixadas com solução de lugol acético 5%, seguindo-se o procedimento de sedimentação em câmaras, segundo Uthermöhl (1958). O procedimento de contagem, em microscópio invertido em aumento de 400 vezes, será o de campos aleatórios (UELINGER, 1964). O cálculo para a densidade fitoplanctônica (ind.ml^{-1}) foi feito a partir da seguinte fórmula, descrita por Lund et. al. (1958):

$$(\text{ind. ml}^{-1}) = n\{1/[(sch)/1000 \times 100000]\}$$

Onde:

n = número de indivíduos contados;

s = área do campo de contagem (μm^2);

c = número campos contados;

h = altura da câmara (mm).

A partir dos dados quantitativos serão calculadas as espécies dominantes e abundantes (LOBO & LEIGTON, 1986). Ainda através dos dados de densidade, serão calculados os índices de diversidade específica (SHANNON-WEANNER, 1963) e equitabilidade (Legendre & Legendre, 1983).

A ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas será avaliada comparando-se com a lista de espécies tóxicas que ocorrem no Brasil (SANT'ANNA et. al., 2008)

❖ Zooplâncton

Serão realizadas análises quantitativas e qualitativas da comunidade zooplancônica. Para os dados quantitativos será necessário a filtração de 100 L de água em rede de plâncton de 68 μm de abertura de malha. A coleta também poderá ser realizada com arrastos horizontais e/ou oblíquos, desde que a rede esteja equipada com fluxômetro para mensurar o volume de água filtrada. Para obter os dados qualitativos as amostras deverão ser coletadas com arraste horizontal e oblíquo com rede de 68 μm , por 5 minutos em cada ponto amostral. O armazenamento deve ser feito em potes plásticos de 500 ml devidamente etiquetados, com tampa protetora anti-vazamento. As amostras de zooplâncton devem ser narcotizadas com 2 ml de água gaseificada ou água tônica e após 2 minutos adicionador formol neutralizado a 4%, para fixação dos organismos. Não se deve adicionar corante rosa de bengala ou qualquer outro às amostras. Para as coletas realizadas no trecho fluvial fazer arrasto, de preferência, sempre perto do banco de macrófitas.

❖ Macrófitas

Para amostragem, as plantas devem ser coletadas utilizando um quadrado de 0,5 m² que deverão ser lançados três vezes aleatoriamente em cada um dos pontos dentro da malha amostral. Para cada ponto amostral são medidas a distância das margens, a transparência e a profundidade da água com fita métrica, disco de Sechhi e corda graduada, respectivamente.

Os espécimes férteis (frondes para plantas vasculares sem sementes, flores e/ou frutos para as Angiospermas) devem ser coletados com no mínimo de três amostras e serem processados de acordo com os métodos usuais em taxonomia vegetal (Bridson & Forman 1998). As amostras devem ser encaminhadas para o Laboratório de Sistemática e Genética Vegetal/PPGBT/CEUNES/UFES para posterior envio para a coleção biológica que as receberá -

Herbário VIES (Universidade Federal do Espírito Santo). Sempre que possível, amostras adicionais deverão ser coletadas (flores e frutos) e acondicionadas em recipientes adequados e preservadas em álcool etílico 70%, para estudos morfológicos e identificação.

Ao término da campanha, o material será transportado em prensa manual para o Laboratório de Sistemática de Grupos Vegetais da UFES-CEUNES, localizado em São Mateus (ES). Neste laboratório, serão realizados o processamento, triagem, herborização e identificação do material coletado.

❖ Perifíton

A coleta da comunidade perifítica será realizada mensalmente, nas 12 estações supracitadas. Nas estações de ambientes lóticos, serão coletadas amostras em cada uma das margens e na região central do rio, sempre que houver substrato colonizado, totalizando 3 amostras por estação amostral. Nos ambientes lênticos, as amostras serão coletadas apenas na margem mais próxima da estação amostral ou no local mais próximo com disponibilidade de substratos, totalizando 1 amostra por estação amostral.

A seleção e coleta do substrato deverão ser rigorosas, uma vez que a comunidade perifítica responde de forma diferente aos substratos. Assim, deve-se manter o mesmo tipo de substrato ao longo das estações amostrais, priorizando a escolha de pequenas rochas (cascalhos, pedregulhos, etc.) como substrato, seguido de macrófitas fixas no sedimento e, no caso de nenhum desses substratos estiver presente, macrófitas flutuantes deverão ser utilizadas como substrato. Na coleta de rochas, o coletor deverá selecionar aquelas de tamanho compatível com a boca do frasco (aprox. 4 cm), de modo que seja possível acomodar a rocha dentro do frasco de coleta. A rocha selecionada deverá estar visualmente colonizada, com uma das faces voltadas para cima, de forma que possa haver incidência luminosa. A rocha deverá ser coletada manualmente, sendo segurada pelas laterais, sem que haja contato das mãos do coletor na área da rocha que será raspada para a obtenção do material perifítico.

Na coleta de macrófitas, tanto fixas no sedimento quanto flutuantes, o coletor deverá selecionar aquelas que não sejam muito jovens, devido à comunidade perifítica não estar madura (clímax), e nem em senescência, devido a não fixação da comunidade perifítica por perda de material vegetal das macrófitas. Ainda, o coletor deve selecionar partes da planta que sejam de fácil determinação da área de colonização (por exemplo, o pecíolo de *Eichhornia* com formato cilíndrico). É crucial que o substrato amostrado em todas as estações amostrais seja de macrófitas da mesma espécie e de idades similares, e que ele seja da mesma parte da planta. Da mesma forma que a coleta com rochas, o coletor não deve tocar na área do substrato a ser raspado. O substrato deve ser manipulado delicadamente para evitar a perda de material que não está fixo ao substrato (material associado). A quantidade de substrato coletado deverá conter uma quantidade considerável de material perifítico adequada para as análises de clorofila-a, análise qualitativa e quantitativa e de peso seco. Pode ser coletado mais de um substrato, desde que do mesmo tipo (mesmo tipo de

seixo, mesma espécie de macrófitas, etc). O material coletado deverá ser acondicionado em pote de polietileno de aproximadamente 250 ml, contendo uma pequena quantidade de água destilada, para formar uma câmara úmida (aproximadamente 10 ml de água destilada). Os frascos devem ser armazenados em câmara resfriada (4°C) até a raspagem do material em laboratório.

A remoção do material perifítico deve ser realizada utilizando-se uma escova de dentes com cerdas macias e jato de água destilada. O manuseio do substrato deve ser feito com o auxílio de pinça de ponta arredondada, com cuidado, evitando a perda de material perifítico e de danos às células. Tanto a pinça, quanto as escovas de dentes devem ser lavadas para remoção do material perifítico que ficou aderido, sendo esta parte da amostra final e não deve ser perdido. O material perifítico raspado deverá estar contido em um volume conhecido. Esse volume será padronizado em 200 ml. Caso a quantidade de água utilizada seja inferior a esse valor, a amostra deverá ser completada com água destilada até esse valor. Evitar utilizar uma quantidade de água maior que esse volume padrão para a raspagem do substrato. Caso isso ocorra, o novo volume deverá ser anotado. É importante notar que a água utilizada na câmara úmida e na limpeza da pinça e da escova de dentes farão parte desse volume padronizado.

A amostra contida neste volume conhecido deverá ser dividida em quatro sub-amostras. Antes da separação, a amostra deve ser homogeneizada, de forma a manter a proporção de material perifítico por volume. As sub-amostras devem ser separadas na seguinte ordem:

- Clorofila: deve ser separado 50 mL da amostra, sem fixador, para a análise de clorofila. Devido à fácil degradação da clorofila, essa sub-amostra deve ser a primeira a ser processada, ainda em campo.
- Análise quantitativa: deve ser separado 50 mL da amostra, armazenado em frasco âmbar e fixado com 0,5 mL de lugol acético 5%. A amostra deve ser mantida no escuro.
- Análise qualitativa e montagem de lâminas de diatomáceas: deve ser separado 70 mL da amostra, armazenado em frasco e fixado com 3 mL de solução formalina 37% (P.A.). A amostra deve ser mantida no escuro.
- Peso seco: de ser separado 30 mL da amostra, sem fixador. A amostra deve ser processada em campo.

Para o processamento da amostra de clorofila a o material perifítico deve ser filtrado em filtro de fibra de vidro (25 mm), utilizando uma seringa, com capacidade de 50 mL, acoplada a um porta-filtro. Em casos de grande quantidade de material perifítico, o filtro poderá entupir antes de toda a amostra ser filtrada. Neste caso, todo o líquido que passar pelo filtro deve ser aferido quanto ao volume (este será utilizado no cálculo da concentração da clorofila). Após a filtração, uma gota de carbonato de magnésio ($MgCO_3$) deverá ser adicionada ao filtro. O filtro contendo a amostra deverá ser retirado do porta-filtro com auxílio de uma pinça, tomando cuidado para não remover o material retido e nem rasgar o filtro. O filtro deverá ser dobrado, com a parte com o material para o interior, e

embrulhado em um envelope de papel alumínio com a identificação da amostra. Em seguida, o filtro deverá ser armazenado em um frasco com sílica gel, para diminuir a umidade, e acondicionado em baixa temperatura, para congelamento. Todo o procedimento deverá ser realizado em local mais sombreado possível, evitando a degradação da clorofila pela luz.

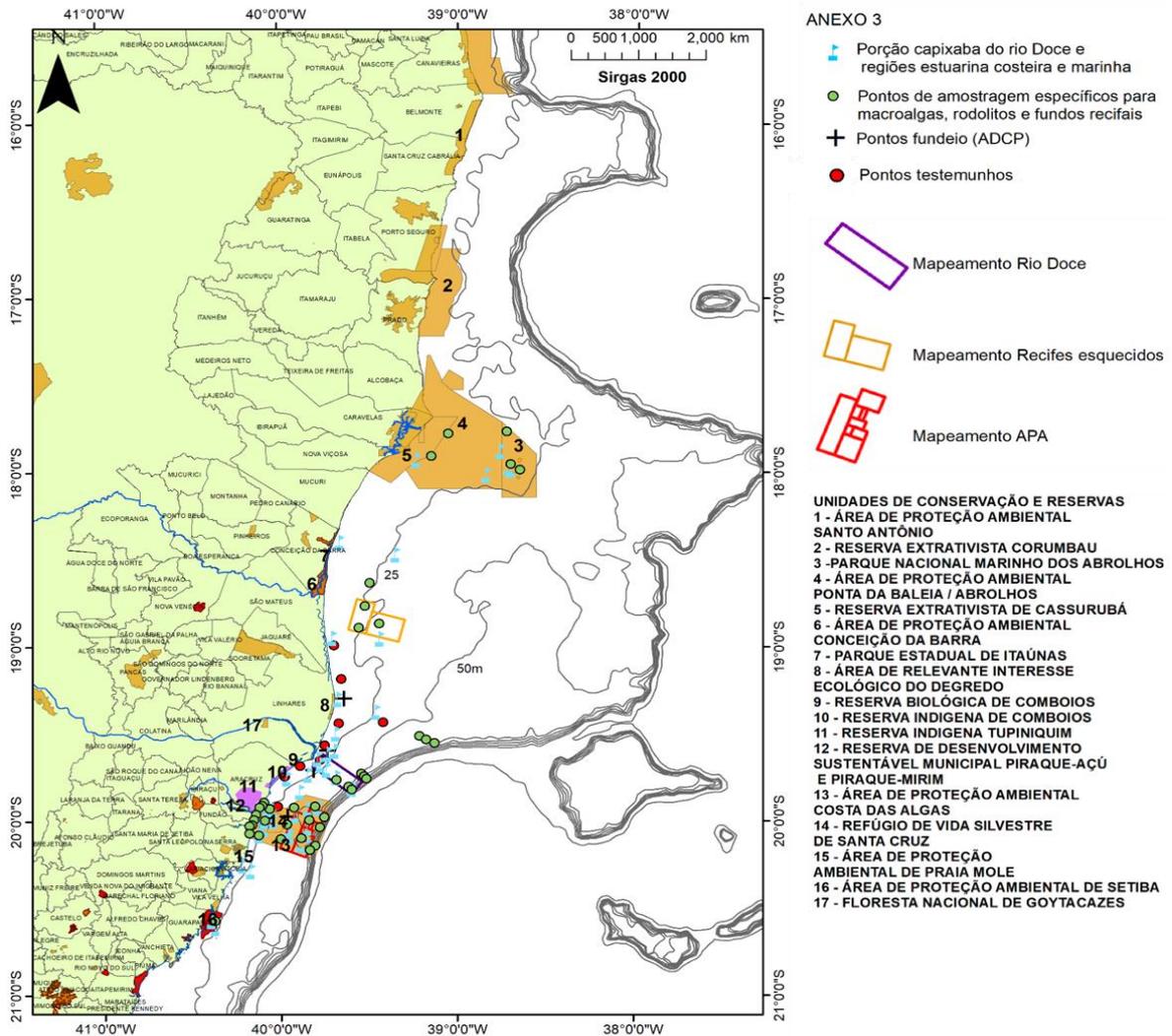
Para o processamento da amostra de peso seco, o material perifítico deve ser filtrado em filtro de fibra de vidro (25 mm), utilizando uma seringa com capacidade de 50 mL, acoplada a um porta-filtro. Para esta análise, é necessário que o peso do filtro, sem o material perifítico, seja conhecido (deve ter seu peso aferido previamente em laboratório). Em casos de grande quantidade de material perifítico, o filtro poderá entupir antes de toda a amostra ser filtrada. Neste caso, todo o líquido que passar pelo filtro deve ser aferido quanto ao volume (este será utilizado no cálculo da concentração de peso seco). O filtro deverá ser dobrado, com a parte com o material para o interior, e embrulhado em um envelope de papel alumínio com a identificação da amostra. Em seguida, o filtro deverá ser armazenado em um frasco com sílica gel, para diminuir a umidade, e acondicionado em baixa temperatura, para congelamento.

Após a raspagem, todos os substratos devem ser reservados para a aferição da área raspada. O método de determinação da área raspada será de acordo com a forma do substrato. Quando o substrato for material vivo (i.e. macrófitas), a determinação da área deve ser realizada logo após o processamento do material perifítico.

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

A malha amostral do sistema aquático marinho é composta por 41 estações para amostragem de água da coluna d'água e sedimento de fundo, 10 estações para coleta de testemunho de sedimento e 4 estações para fundeio (Figura 17 e Quadro 8). As estações que possuem amostragem apenas semestral estão indicadas em vermelho. As estações que possuem amostragem trimestral e semestral estão indicadas em azul. As estações que possuem amostragem mensal, trimestral e semestral estão indicadas em verde. Este arranjo espacial foi aprovado na Reunião da Câmara Técnica de Biodiversidade – CTBio de 18/07/2018. Três dos pontos na plataforma continental próximos ao estuário Piraquê-Açú e Mirim foram deslocados em direção offshore por estarem anteriormente posicionados em região de lateritas.

Figura 17. Malha amostral do ecossistema aquático marinho.



Quadro 8. Coordenadas UTM (datum, SIRGASS 2000) das estações amostrais do monitoramento do ecossistema aquático marinho (Anexo 3).

| Estação Amostral | Local | Coordenadas UTM | | Frequência de amostragem |
|------------------|---------------------|-----------------|-----------|--------------------------|
| | | Northing | Easting | |
| 1 | Guarapari | 7723667,51 | 355157,53 | Semestral |
| 2 | Guarapari | 7719405,70 | 357394,00 | Semestral |
| 3 | Vitoria | 7759039,92 | 373371,61 | Trimestral |
| 4 | Vitoria | 7755589,41 | 378037,70 | Trimestral |
| 5 | APA Costa das Algas | 7790616,16 | 384043,41 | Trimestral |
| 6 | APA Costa das Algas | 7791253,08 | 390338,15 | Trimestral |
| 7 | APA | 7791153,02 | 404235,25 | Trimestral |
| 8 | APA | 7795785,24 | 418100,98 | Trimestral |

| Estação Amostral | Local | Coordenadas UTM | | Frequência de amostragem |
|------------------|------------|-----------------|-----------|--------------------------|
| | | Northing | Easting | |
| | | 7782339,56 | 386405,26 | Trimestral |
| 10 | APA | 7777853,69 | 401063,33 | Trimestral |
| 11 | APA | 7771576,57 | 411733,92 | Trimestral |
| 12 | APA | 7772380,88 | 407338,56 | Trimestral |
| 13 | APA | 7782961,63 | 411664,43 | Trimestral |
| 14 | APA | 7787276,74 | 391745,12 | Trimestral |
| 15 | APA | 7795168,81 | 411676,15 | Trimestral |
| 16 | APA | 7781684,03 | 400470,49 | Trimestral |
| 17 | Foz RD | 7842923,48 | 428269,42 | Mensal |
| 18 | Foz RD | 7832036,40 | 427721,54 | Mensal |
| 19 | Foz RD | 7829898,02 | 423532,88 | Mensal |
| 20 | Foz RD | 7826708,20 | 417558,92 | Mensal |
| 21 | Foz RD | 7823040,03 | 419392,72 | Mensal |
| 22 | Foz RD | 7819937,86 | 422769,21 | Mensal |
| 23 | Foz RD | 7815169,35 | 428467,96 | Mensal |
| 24 | Foz RD | 7805922,15 | 407209,37 | Mensal |
| 25 | Foz RD | 7816813,23 | 411879,35 | Mensal |
| 26 | Foz RD | 7814269,46 | 399459,03 | Mensal |
| 27 | Foz RD | 7807959,70 | 437864,77 | Mensal |
| 28 | Degredo | 7864890,95 | 429405,98 | Trimestral |
| 29 | Degredo | 7856730,04 | 451968,99 | Trimestral |
| 30 | Barra Nova | 7903598,94 | 426147,63 | Trimestral |
| 31 | Barra Nova | 7903337,64 | 454268,69 | Trimestral |
| 32 | Itaunas | 7964547,64 | 430449,88 | Trimestral |
| 33 | Itaunas | 7956840,18 | 463553,02 | Trimestral |
| 34 | Abrolhos | 8010704,12 | 532066,24 | Semestral |
| 35 | Abrolhos | 8022616,40 | 525453,08 | Semestral |
| 36 | Abrolhos | 8017006,47 | 475936,82 | Semestral |
| 37 | Abrolhos | 8011813,51 | 530165,27 | Semestral |
| 38 | Abrolhos | 8007563,45 | 517177,23 | Semestral |
| 39 | APA | 7794893,00 | 388985,00 | Trimestral |
| 40 | APA | 7787608,00 | 386303,00 | Trimestral |
| 41 | APA | 7778345,00 | 382936,00 | Trimestral |

A relação dos parâmetros a serem monitorados é apresentada na Tabela 6, as amostragens serão mensais (11 pontos amostrais), trimestrais (34 pontos amostrais) e semestrais (41 pontos amostrais) para as matrizes coluna d'água e sedimentos superficiais. Para a matriz testemunho de sedimento a amostragem será única (10 pontos amostrais). As amostragens semestrais foram programadas de acordo com a sazonalidade dos períodos seco e chuvoso, sendo escolhido o mês

de setembro como representativo para o período seco e o mês de janeiro como representativo para o período chuvoso.

Tabela 6. Relação dos parâmetros a serem monitorados.

| Parâmetros Físicos | Parâmetros físico-químicos e hidroquímicos | Parâmetros hidrobiológicos |
|--|---|--|
| <u>Matriz coluna d'água</u> | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura • Turbidez • Material particulado em suspensão | <ul style="list-style-type: none"> • Salinidade • Condutividade elétrica • Oxigênio dissolvido • Alcalinidade • Predox • Metais • Nutrientes (N, P e Si) <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos graxos • Hidrocarbonetos • Isótopos estáveis (particulado) <ul style="list-style-type: none"> • Elementar (particulado) | <ul style="list-style-type: none"> • Clorofila a • Fitoplâncton • Zooplâncton |
| <u>Matriz sedimento superficial</u> | | |
| Parâmetros Físicos | Parâmetros físico-químicos e hidroquímicos | Parâmetros hidrobiológicos |
| <ul style="list-style-type: none"> • <u>Matriz sedimento superficial</u> | <ul style="list-style-type: none"> • | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria • Densidade | <ul style="list-style-type: none"> • Matéria orgânica • Compostos orgânicos • Nutrientes (N e P) <ul style="list-style-type: none"> • Metais • Hidrocarbonetos • Isótopos estáveis (particulado) <ul style="list-style-type: none"> • Elementar (particulado) | |
| <u>Matriz sedimento testemunho</u> | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria | <ul style="list-style-type: none"> • Nutrientes (N e P) <ul style="list-style-type: none"> • Metais | |

5.3.1 Matriz coluna d'água

❖ Hidrodinâmica

- Boias meteoceanográficas (BMO) e linhas de fundeio

Quatro boias meteo-oceanográficas (BMO) deverão ser dotadas de moonpools para a instalação dos sensores para a medição de temperatura, salinidade, pressão, clorofila-a, oxigênio dissolvido e turbidez da água do mar em superfície.

Em um fundeio, deverá ser acoplada à BMO uma estação meteorológica para a medição da direção e velocidade do vento, temperatura e umidade relativa do ar, e pressão atmosférica. O casco da boia deverá ser de fibra de vidro com preenchimento interno de material flutuante (espuma poliuretano de célula fechada), para que na ocorrência de abaloamento da boia e a mesma permaneça com flutuação. O casco também deverá possuir flutuabilidade de reserva de pelo menos 1,2 tonelada. O fundeio deverá ocorrer com erro máximo de 100 metros no posicionamento. Para tanto, o sistema de posicionamento deverá ser aferido de acordo com as recomendações da NORMAM-25.

A princípio, o equipamento que fará as medições de temperatura, salinidade, pressão, turbidez, clorofila-*a* e oxigênio dissolvido será o modelo HydroCAT EP, da fabricante Sea-Bird, ou outro modelo similar. O equipamento será configurado conforme o manual do fabricante para fornecer medições a cada 30 min. Um equipamento deverá ser instalado em cada boia de superfície, por meio de moonpool do próprio casco da boia, com suas sondas submersas. A instalação no moonpool do casco deve facilitar a manutenção, não sendo necessária a retirada do casco da água para manutenção do equipamento. Esta forma de fixação também garante que as sondas dos equipamentos se mantenham na cota superficial da coluna d'água. Deve-se garantir que os sensores de superfície estejam no máximo a 1 metro de profundidade, sempre submersos independentemente das condições de mar.

Uma das boias deverá possuir uma estação meteorológica, que deverá registrar em seu datalogger os parâmetros de vento médio (intensidade em m/s e direção relativa ao norte verdadeiro), rajada de vento (para ventos maiores que 3 segundos, intensidade em m/s e direção relativa ao norte verdadeiro), temperatura do ar (°C), pressão atmosférica (hPa) e umidade relativa do ar (%). Os dados armazenados devem ser médias de 10 minutos (coletados a 1 Hz com correção de heading da boia a cada 30 minutos).

A linha de fundeio deverá ser compatível com a profundidade do ponto e suportar as condições ambientais extremas do local. Deverá ser constituída por componentes fabricados no país de forma a facilitar eventuais manutenções corretivas. Todo o serviço de lançamento da boia, manutenção da linha de fundeio com a limpeza, manutenção periódica, reinicialização e reinstalação dos equipamentos e aquisição dos dados deverá ser executado a cada 30 dias. Os procedimentos de limpeza, substituição de baterias e manutenção periódica dos equipamentos deverá seguir as orientações dos fabricantes dos equipamentos, em seus respectivos manuais.

As linhas de fundeio deverão ser instrumentadas com dataloggers do modelo DST CTD, da fabricante Star-Oddi, ou similar, para medição de temperatura, salinidade e pressão do mar, adquirindo dados a cada 30 min. Estes sensores deverão ser instalados nas linhas de fundeio e fixados com abraçadeiras plásticas, de forma a garantir um espaçamento razoavelmente igual ao longo da coluna d'água. As mesmas exigências sobre manutenção e reinstalação dos HydroCATs EP são pertinentes aos DST-CTDs.

- Estrutura de fundeio (ADCP e HydroCAT EP de fundo)

A uma distância máxima de 100 metros do raio de giro de cada BMO deverá ser fundeada uma estrutura com um perfilador acústico (Figura 17 e Quadro 9), modelos Signature 500 ou Signature 1000, da fabricante Nortek, ou similar, para a medição de ondas, correntes, retorno do eco sonoro e nível d'água, além de outro HydroCAT EP, ou similar. O equipamento será configurado conforme o manual do fabricante para fornecer medições a cada 30 min. Essa estrutura de fundo deverá ser feita em aço inox 316L não magnético e possuir gimble para garantir a verticalidade do transdutor. Deverá ainda ser acoplada a uma poita com massa mínima de 2,5 toneladas, para evitar sua movimentação no caso de passagem de rede de arrasto, já que se trata de um ambiente com intensa atividade pesqueira. Os procedimentos de limpeza, substituição de baterias e manutenção periódica dos equipamentos deverá seguir as orientações dos fabricantes dos equipamentos, em seus respectivos manuais.

O lançamento da linha de fundeio será iniciado pela boia de superfície. Posteriormente, lançam-se as correntes e manilhas e finaliza a instalação com a descida e o posicionamento da poita nos pontos programados com o auxílio de um arco de popa ou um guincho. A recuperação dos equipamentos para a transferência dos dados coletados e substituição de baterias será realizadas periodicamente com o auxílio de mergulhadores.

Em laboratório, o CTD deve ser configurado e programado de acordo com o manual de instruções do equipamento (disponível no LabPoseidon). Em campo, o CTD deve ser ligado e inserido na água. Logo em seguida, iniciar a descida do equipamento com a velocidade máxima de 1 m/s com o auxílio de uma corda graduada. Olhar a profundidade marcada pelo ecobatímetro da embarcação e descer até 2 m antes do fundo por medidas de segurança do aparelho e confiabilidade dos dados. É importante que a deriva do equipamento seja observada, deve-se manter a corda mais reta possível ao longo da coluna de água. Na amostragem in situ em cada estação amostral serão obtidos dados termohalinos (temperatura e condutividade, posteriormente convertida em salinidade), pressão, concentração de clorofila-a ou fluorescência, turbidez e, se disponível, também oxigênio dissolvido. O turbidímetro deve estar calibrado para leituras entre 0 e 100 NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez).

IMPORTANTE: Para que exista uma coerência na análise de dados, deve ser realizado o maior número de pontos amostrais possíveis em um mesmo dia, iniciando pelos pontos mais próximos à costa e seguindo em direção aos mais afastados da costa. É **IMPORTANTE** que seja realizado a coleta de dados dos dois primeiros pontos próximos à foz do rio doce (sd1 e sd2) e o primeiro ponto ao sul (sds20) no mesmo dia.

Em cada estação deve ser anotado:

- Nome da estação;
- Latitude marcada pelo GPS da embarcação;

- Longitude marcada pelo GPS da embarcação;
- Sistema de coordenada geográfica e datum do GPS da embarcação;
- Profundidade marcada pelo ecobatímetro da embarcação;
- Data;
- Horário inicial da descida do CTD;
- Horário final de subida do CTD.

Quadro 9. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do Monitoramento Integrado dos ecossistemas aquáticos marinhos (Anexo 3).

| Estação | Latitude | Longitude |
|----------------|-----------------|------------------|
| VIX1 | -20,2622 | -40,2125 |
| VIX2 | -20,2937 | -40,1680 |
| BN2 | -18,9618 | -39,4344 |
| BN1 | -18,9587 | -39,7015 |
| ABR1 | -17,9349 | -39,2272 |
| ABR2 | -17,9917 | -38,6971 |
| ABR3 | -17,9817 | -38,7151 |
| ABR4 | -17,8841 | -38,7597 |
| ABR5 | -18,0203 | -38,8377 |
| ITA1 | -18,4080 | -39,6585 |
| ITA2 | -18,4785 | -39,3452 |
| DEG1 | -19,3086 | -39,6720 |
| DEG2 | -19,3830 | -39,4574 |
| SDN13 | -19,5071 | -39,6836 |
| SDN30 | -19,6054 | -39,6893 |
| SDN20 | -19,6246 | -39,7293 |
| SD1 | -19,6532 | -39,7864 |
| SD2 | -19,6864 | -39,7691 |
| SD3 | -19,7146 | -39,7370 |
| SD4 | -19,7579 | -39,6828 |
| SDS30 | -19,8405 | -39,8861 |
| SDS20 | -19,7423 | -39,8410 |
| SDS13 | -19,7647 | -39,9597 |
| SD | -19,8233 | -39,5933 |
| CA1 | -19,9776 | -40,1083 |
| CA2 | -19,9722 | -40,0481 |
| CA3 | -19,9738 | -39,9153 |
| CA4 | -19,9326 | -39,7826 |
| CA5 | -20,0525 | -40,0862 |

| | | |
|----------------|-----------------|------------------|
| CA6 | -20,0938 | -39,9463 |
| CA7 | -20,1511 | -39,8446 |
| Estação | Latitude | Longitude |
| CA8 | -19,9392 | -40,0608 |
| CA9 | -20,0050 | -40,0869 |
| CA10 | -20,0882 | -40,1019 |
| CA11 | -20,1436 | -39,8866 |
| CA12 | -20,0482 | -39,8447 |
| CA13 | -20,0082 | -40,0349 |
| CA14 | -19,9379 | -39,8440 |
| CA15 | -20,0592 | -39,9518 |
| GUA1 | -20,5804 | -40,3897 |
| GUA2 | -20,6191 | -40,3686 |

Quadro 10. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do Fundeio de equipamentos do subprojeto Modelagem (Anexo 3).

| ESTAÇÃO | LATITUDE | LONGITUDE |
|----------------|-----------------|------------------|
| Fundeio 1 | -19,9825 | -39,9585 |
| Fundeio 2 | -19,715448 | -39,809839 |
| Fundeio 3 | -19,604157 | -39,733296 |
| Fundeio 4 | -19,305261 | -39,637904 |

❖ Material particulado em suspensão

As coletas de água serão realizadas em três profundidades ao longo da coluna d'água: superfície (15 a 30 cm), meio (metade da profundidade do ponto amostral) e próximo ao fundo (cerca de 50 cm acima do sedimento) por meio de Garrafas de Van Dorn. A profundidade amostrada será monitorada por meio de um CTD. A água coletada será armazenada em frascos de 1 L de polietileno devidamente rotulados seguindo o padrão de etiquetas da Rede Rio Doce Mar. Em seguida, os frascos contendo as amostras deverão ser mantidos refrigerados em local protegido da luz solar até que sejam processados em laboratório.

❖ Parâmetros físico-químicos

Ainda na embarcação, uma alíquota da amostra coletada para a análise do material particulado em suspensão deverá que ser submetida à medição de turbidez por meio de um *Optical Backscatter* em um balde imediatamente após coleta.

- Nutrientes

As amostragens para análise dos nutrientes dissolvidos na coluna d'água serão realizadas mensalmente para determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, nitrogênio total, fosfato, fósforo total e silício.

A coleta das amostras de água ao longo da coluna d'água deverá ser feita com auxílio de garrafas coletoras (horizontal ou vertical), não metálicas e ativadas por mensageiro, e seguir a denominação de superfície (0 a 15 cm) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). As amostras devem ser transferidas para os frascos de armazenamento (previamente descontaminadas) com o mínimo de perturbação possível, preferência com auxílio de mangueiras de silicone. Durante todo o procedimento de coleta, luvas sem talco (nitrila) devem ser utilizadas para evitar contaminação das amostras.

Para o lançamento das garrafas, utilizar um cabo para acoplar a garrafa. Colocar poitas no cabo (pesos de chumbo) suficientes para mantê-lo perpendicular ou horizontal à lâmina d'água, verificar se há cabo suficiente para a profundidade do lançamento; armar a garrafa puxando suas tampas inferior e superior e prendendo seus cabos ao sistema de desarme.

➤ Recipientes para armazenamento das amostras de nutrientes:

Utilizar frascos de polietileno (preferencialmente) ou de vidro, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita, e tampa de rosca. Para determinação dos nutrientes dissolvidos serão necessários 1000 ml de água.

➤ Limpeza e descontaminação dos frascos para nutrientes:

- Rinsar 2 vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido clorídrico P.A.;
- Lavar 3 vezes com água desmineralizada;
- Rinsar 3 vezes com água ultrapura;

➤ Deixar secar antes de usar.

- Preservação e conservação das amostras para nutrientes a bordo:

Para a preservação das amostras de nutrientes dissolvidos a bordo, as garrafas contendo as amostras após a coleta deverão ser congeladas antes de seguirem para o laboratório. As mesmas deverão ser analisadas até, no máximo 2 dias após a coleta para nitrogênio amoniacal e 5 dias para os demais nutrientes dissolvidos.

➤ Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de água de mar, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização das garrafas oceanográficas constantes neste manual;

- Certeza do correto funcionamento da garrafa amostradora;
- Descartar amostras onde a garrafa é recuperada parcialmente preenchida com água (reparar ou trocar a garrafa);
- Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação da garrafa (descontaminar ou trocar a garrafa).
- Número de réplicas:

Nos estudos rotineiros de monitoramento ou caracterização do ambiente marinho, via de regra, apenas uma única amostra de água do mar na profundidade de interesse é suficiente para cada estação de amostragem. Somente quando claramente especificado, a depender da finalidade da coleta, serão necessárias coletas de amostras em duplicata e triplicata.

❖ Hidrobiológicos (clorofila a e feopigmentos - pigmentos fotossintetizantes)

Serão coletados 1 L de água, acondicionados em frascos de polipropileno e que será refrigerado, em local abrigado da luz, para posterior determinação em laboratório. Será realizada, em laboratório, filtração com filtro de fibra de vidro de 47mm de diâmetro e porosidade média de 0,7µm e a determinação de clorofila a e feopigmentos será através de espectrofotometria, por meio da extração em acetona 90%.

❖ Compostos orgânicos

As coletas das amostras de água para análise dos compostos orgânicos serão realizadas mensalmente e irão abranger os seguintes parâmetros: hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), biomarcadores lipídicos, ácidos graxos, pesticidas, PCBs e matéria orgânica dissolvida.

A coleta das amostras de água ao longo da coluna d'água deverá ser feita com auxílio de garrafas coletoras (horizontal ou vertical), não metálicas e ativadas por mensageiro, e seguir a denominação de superfície (0 a 15 cm) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). As amostras devem ser transferidas para os frascos de armazenamento (previamente descontaminadas) com o mínimo de perturbação possível, preferência com auxílio de mangueiras de silicone. Durante todo o procedimento de coleta, luvas sem talco (nitrila) devem ser utilizadas para evitar contaminação das amostras.

Para o lançamento das garrafas, utilizar um cabo para acoplar a garrafa. Colocar poitas no cabo (pesos de chumbo) suficientes para mantê-lo perpendicular ou horizontal à lâmina d'água, verificar se há cabo suficiente para a profundidade do lançamento; armar a garrafa puxando suas tampas inferior e superior e prendendo seus cabos ao sistema de desarme.

- Recipientes para armazenamento das amostras de compostos orgânicos:

Utilizar frascos de vidro âmbar de 4 litros, descontaminados, de boca estreita, com batoque de vedação e tampa de rosca. Cada parâmetro deverá ser coletado em frascos separados e identificados, seguindo as seguintes proporções:

- 8000 mL de amostras para determinação de hidrocarbonetos, ácidos graxos, fenóis e outros biomarcadores lipídicos; e determinação de pesticidas e PCBs;
- 4000 mL de amostras para determinação de compostos emergentes.
- - Limpeza e descontaminação dos frascos de vidro para orgânicos:
 - Lavar 3 vezes com água ultrapura; esperar secar;
 - Rinsar 3 vezes com acetona grau ultrapuro;
 - Rinsar 3 vezes os frascos com diclorometano grau ultrapuro.
- Preservação e conservação das amostras para orgânicos a bordo:

Para preservação das amostras dos parâmetros orgânicos, colocar imediatamente após a coleta todas as amostras na geladeira ou isopor com gelo e manter a 4 °C (não congelar). Não necessita adicionar preservantes.

As amostras devem ser estocadas a 4 °C no escuro e devem ser extraídas até 7 dias após a coleta

- Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de água de mar, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização das garrafas oceanográficas constantes neste manual;
- Certeza do correto funcionamento da garrafa amostradora;
- Descartar amostras onde a garrafa é recuperada parcialmente preenchida com água (reparar ou trocar a garrafa);
- Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação da garrafa (descontaminar ou trocar a garrafa).
- Número de réplicas:

Nos estudos rotineiros de monitoramento ou caracterização do ambiente marinho, via de regra, apenas uma única amostra de água do mar na profundidade de interesse é suficiente para cada estação de amostragem. Somente quando claramente especificado, a depender da finalidade da coleta, serão necessárias coletas de amostras em duplicata e triplicata.

- Controle de qualidade:

Deverão ser obtidas amostras como “Branco de Campo” para avaliação do ambiente aonde as amostras são coletadas/transferidas. Em um determinado período, preferencialmente a cada dois dias, um frasco de coleta (uma garrafa de cada parâmetro) deverá ser aberto e exposto ao ambiente onde é feita a retirada das amostras dos coletores e em seguida fechado. Estas amostras deverão ser identificadas como “Branco de Campo”, datadas e ter seu registro efetivado no relatório de bordo.

❖ Metais

As coletas de água para análise dos metais na coluna d’água serão realizadas mensalmente, e contemplam análises de metais totais, metais dissolvidos, mercúrio total e mercúrio dissolvido, além dos metais e mercúrio associados ao material particulado.

Metais totais podem ser definidos pelo teor total dos metais presentes na amostra de água, representando a fração solúvel somada à fração particulada. Considerar alumínio, arsênio, bário, berílio, boro, cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês, mercúrio, níquel, prata, selênio, tálio, urânio, zinco e vanádio, caso os metais não estejam especificados no projeto em questão.

Os Metais dissolvidos podem ser definidos pelo teor de metais presentes na amostra de água previamente filtrada, não contemplando, assim, a fração particulada. Considerar alumínio, cobre e ferro, caso os metais não estejam especificados no projeto em questão.

A coleta das amostras de água ao longo da coluna d’água deverá ser feita com auxílio de garrafas coletoras (horizontal ou vertical), não metálicas e ativadas por mensageiro, e seguir a denominação de superfície (0 a 15 cm) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). As amostras devem ser transferidas para os frascos de armazenamento (previamente descontaminadas) com o mínimo de perturbação possível, preferência com auxílio de mangueiras de silicone. Durante todo o procedimento de coleta, luvas sem talco (nitrila) devem ser utilizadas para evitar contaminação das amostras.

Para o lançamento das garrafas, utilizar um cabo para acoplar a garrafa. Colocar poitas no cabo (pesos de chumbo) suficientes para mantê-lo perpendicular ou horizontal à lâmina d’água, verificar se há cabo suficiente para a profundidade do lançamento; armar a garrafa puxando suas tampas inferior e superior e prendendo seus cabos ao sistema de desarme.

- Recipientes para armazenamento das amostras de metais:

Utilizar frascos de polipropileno (preferencialmente) ou de vidro, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita, com batoque de vedação (apenas frascos de Vidro) e tampa de rosca. Coletar cada parâmetro em frascos separados, seguindo as seguintes proporções:

- 1000 ml de amostras para determinação de metais associado ao material particulado em suspensão e fração dissolvida;
- 1000 ml de amostras para determinação de mercúrio associado ao material particulado em suspensão e fração dissolvida;

- 500 ml de amostra para determinação de metais totais;
- 500 ml para determinação de metais dissolvidos.
- 500 ml para determinação de mercúrio total;
- 500 ml para determinação de mercúrio dissolvido.

Obs 1: As amostras para análise de mercúrio (Hg) devem ser coletadas separadamente.

- Limpeza e descontaminação dos frascos para metais:
 - Rinsar 2 vezes os frascos novos com solução 1:1 de ácido nítrico P.A.;
 - Lavar 3 vezes com água desmineralizada;
 - Rinsar 3 vezes com água ultrapura;
 - Deixar secar antes de usar.
- Preservação e conservação das amostras para metais a bordo:

As amostras para metais totais deverão ser preservadas pela adição de gotas de solução de ácido nítrico suprapur até $\text{pH} < 2$ e, em seguida, deverão ser refrigeradas. A refrigeração deverá ser a 4°C e mantida até o momento da análise.

Amostras para metais dissolvidos deverão ser filtradas em membrana $0,45\mu\text{m}$, antes de serem acidificadas (mesmo procedimento acima). O material usado para filtração deverá estar descontaminado conforme procedimento anteriormente descrito. As amostras deverão ser analisadas até, no máximo 28 dias após a coleta, para mercúrio, e não mais que 3 meses, para os demais metais.

Obs 1: Não encher totalmente os frascos.

Obs 2: A adição de ácido à amostra poderá ser suprimida caso os frascos enviados para coleta já contenham o ácido necessário para acidificar a amostra a $\text{pH} < 2$.

- Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de água de mar, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização das garrafas oceanográficas constantes neste manual;
- Certeza do correto funcionamento da garrafa amostradora;
- Descartar amostras onde a garrafa é recuperada parcialmente preenchida com água (reparar ou trocar a garrafa);

➤ Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação da garrafa (descontaminar ou trocar a garrafa).

- Número de réplicas:

Nos estudos rotineiros de monitoramento ou caracterização do ambiente marinho, via de regra, apenas uma única amostra de água do mar na profundidade de interesse é suficiente para cada estação de amostragem. Somente quando claramente especificado, a depender da finalidade da coleta, serão necessárias coletas de amostras em duplicata e triplicata.

- Controle de qualidade:

Deverão ser obtidas amostras como “Branco de Campo” para avaliação do ambiente aonde as amostras são coletadas/transferidas. Em um determinado período, preferencialmente a cada dois dias, um frasco de coleta (uma garrafa de cada parâmetro) deverá ser aberto e exposto ao ambiente onde é feita a retirada das amostras dos coletores e em seguida fechado. Estas amostras deverão ser identificadas como “Branco de Campo”, datadas e ter seu registro efetivado no relatório de bordo.

- ❖ Elementar (particulados)

Os procedimentos de coletas deverão seguir o mesmo descrito na seção de nutrientes dissolvidos, sendo as amostras de água armazenadas em frascos de polipropileno ou vidro previamente descontaminados.

- Limpeza e descontaminação dos frascos para elementar (particulado)

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

- Preservação e conservação das amostras para elementar (particulado):

As amostras deverão ser mantidas resfriadas em temperaturas aprox. de 4°C até a chegada em laboratório. Caso as amostras sejam filtradas durante o embarque, os filtros (previamente secos e pesados) deverão ser mantidos congelados e a fração dissolvida, armazenada resfriada em temperaturas aprox. de 4°C.

- Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de água de mar, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização das garrafas oceanográficas constantes neste manual;

- Certeza do correto funcionamento da garrafa amostradora;
 - Descartar amostras onde a garrafa é recuperada parcialmente preenchida com água (reparar ou trocar a garrafa);
 - Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação da garrafa (descontaminar ou trocar a garrafa).
- Número de réplicas:

Nos estudos rotineiros de monitoramento ou caracterização do ambiente marinho, via de regra, apenas uma única amostra de água do mar na profundidade de interesse é suficiente para cada estação de amostragem. Somente quando claramente especificado, a depender da finalidade da coleta, serão necessárias coletas de amostras em duplicata e triplicata.

❖ Isótopos (particulados)

Idem Elementar particulado.

5.3.2 Matriz sedimento superficial

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

❖ Aspectos físicos (Granulometria e mineralogia)

Para a análise de granulometria, uma alíquota da amostra coletada deverá ser armazenada em pote de polietileno obtendo cerca de 500 g no caso de sedimento fino e cerca de 800 g no caso de sedimento cascalhoso (carbonato). Cada pote deverá ser devidamente rotulado seguindo o modelo de etiqueta da Rede Rio Doce Mar e armazenado em engradados.

A amostra para análise de mineralogia será recolhida e armazenada juntamente com aquela coletada para a análise de granulometria, descrita no item anterior.

❖ Parâmetros físicos-químicos

- pH e P_{redox}

A medição do pH e do potencial redox no sedimento será realizada a partir de um pHmetro de solo com o sedimento ainda na draga. O acesso ao sedimento será feito por meio da tampa da parte superior da draga

- Densidade

Para a análise de densidade, uma alíquota dos centímetros superficiais (2 primeiros cm) da amostra de sedimento superficial deve ser recolhida por meio de um pote de rosca de polietileno (de 20 mL) de peso conhecido. É importante que este pote seja totalmente preenchido pela amostra para conhecimento exato do volume coletado. A amostra deverá ser devidamente rotulada seguindo o modelo de etiqueta. Em seguida, os potes contendo as amostras deverão ser mantidos refrigerados em local protegido da luz solar até que sejam processados em laboratório.

❖ Matéria orgânica

O sedimento superficial será coletado mensalmente para análise dos compostos orgânicos. Sendo que os seguintes parâmetros serão avaliados: hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), biomarcadores lipídicos, ácidos graxos, pesticidas, PCBs e matéria orgânica dissolvida.

A coleta das amostras de sedimento deve ser realizada utilizando-se amostradores de fundo, tais como pegadores do tipo busca fundo (amostradores tipo draga: Petersen, Ekman ou van Veen) ou do tipo testemunhadores (“core sampler” ou “corer”). Estes amostradores devem ser utilizados preferencialmente em superfícies de apoio e com sistemas de içamento.

- Recipientes para armazenamento das amostras de compostos orgânicos:

Amostras de sedimento para análise de compostos orgânicos deverão ser acondicionadas em marmitas de alumínio e estocadas em freezers até a desmobilização e envio para o laboratório.

- Limpeza e descontaminação:

As marmitas de alumínio, espátulas e/ou colheres de coletas deverão estar previamente descontaminadas através de calcinação em mufla a 450°C por 6h e posterior rinsagem com cloreto de metileno grau ultrapuro.

- Preservação e conservação das amostras para orgânicos a bordo:

Toda a manipulação do material de coleta e amostras deverá ser feita mediante a utilização de luvas sem talco (nitrila). Para as coletas de sedimento superficial deverão ser utilizadas dragas/pegadores de fundo, recipientes de alumínio (marmitas) e espátulas de aço inox ou colheres de aço inox. Estes recipientes deverão estar devidamente acondicionados em material próprio (envoltos em papel alumínio descontaminado, este ser trocado entre cada amostragem).

Quando for utilizada draga/pegadores de fundo, o material para análise deverá ser retirado da parte central do sedimento, no intervalo máximo de até 5 cm abaixo da camada mais externa. A retirada das amostras deve ser feita o mais rápido possível, pois há o risco de oxidação e consequente alteração da amostra quanto maior a sua exposição. A cada amostra retirada, anotar a profundidade e descrever características importantes tais como: (cor, textura, odor, presença ou não de óleo, iridescência, etc.).

Após a coleta, as amostras deverão ser armazenadas em recipientes de alumínio descontaminados. Depois de fechados, os recipientes deverão ser envoltos em papel alumínio e, posteriormente, em sacos plásticos. As amostras deverão ser congeladas em campo e mantidas em freezer até o momento de análise. Se não houver possibilidade de congelar as amostras em campo, as amostras deverão ser mantidas em geladeiras térmicas, até a chegada ao laboratório, onde deverão ser congeladas.

- Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de sedimento, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização dos amostradores constantes;
- Certeza do correto funcionamento do amostrador;
- Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação do amostrador durante o seu içamento ou durante a retirada da amostra para transferência para os recipientes de armazenamento;
- As amostras devem estar devidamente identificadas, bem como todos os dados referentes a sua retirada registradas em um controle de bordo.

- Número de réplicas:

Nos estudos rotineiros de monitoramento ou caracterização do ambiente marinho, via de regra, apenas uma única amostra de sedimento superficial é suficiente para cada estação de amostragem. Somente quando claramente especificado, a depender da finalidade da coleta, serão necessárias amostras em duplicata e triplicata. Tais demandas podem ser estabelecidas/orientadas pelo coordenador de embarque a depender da finalidade da coleta.

- Controle de qualidade:

Deverão ser obtidas amostras como “Branco de Campo” para avaliação do ambiente aonde as amostras são coletadas/transferidas. Em um determinado período, preferencialmente a cada dois dias, um frasco de coleta (marmitta) deverá ser aberto e exposto ao ambiente onde é feita a retiradas amostras dos coletores e em seguida fechado. Estas amostras deverão ser identificadas como “Branco de Campo”, datadas e ter seu registro efetivado no relatório de bordo.

❖ Nutrientes

Para determinação de orto-fosfato em água intersticial e de fósforo total no sedimento, amostras serão coletadas com o amostrador do tipo busca fundo Van Veen. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátulas de polietileno e acondicionadas em potes plásticos e refrigeradas para posterior determinação em laboratório. Em laboratório a concentração dos nutrientes será determinada por espectrofotometria.

❖ Metais

As coletas de sedimento superficial para análises de metais totais e mercúrio serão realizadas mensalmente. Considerar alumínio, arsênio, bário, berílio, boro, cádmio, chumbo, cobre, cromo, ferro, manganês, mercúrio, níquel, prata, selênio, tálio, urânio, zinco e vanádio, caso os metais não estejam especificados no projeto em questão.

A coleta das amostras de sedimento deve ser realizada utilizando-se amostradores de fundo, tais como pegadores do tipo “busca fundo” (amostradores tipo draga: Petersen, Ekman ou van Veen) ou do tipo testemunhadores (“core sampler” ou “corer”). Estes amostradores devem ser utilizados preferencialmente em superfícies de apoio e com sistemas de içamento. Durante todo o procedimento de coleta, luvas sem talco (nitrila) devem ser utilizadas para evitar contaminação das amostras.

- Recipientes para armazenamento das amostras de metais:

Utilizar potes de polietileno, todos de primeiro uso, previamente descontaminados e tampa de rosca. Sendo que as amostras para análise de mercúrio (Hg) devem ser coletadas separadamente.

- Limpeza e descontaminação dos frascos para metais:

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

- Preservação e conservação das amostras para metais a bordo:

As amostras deverão ser congeladas em campo e mantidas em freezer até o momento de análise. Se não houver possibilidade de congelar as amostras em campo, as amostras deverão ser mantidas em geladeiras térmicas, até a chegada ao laboratório, onde deverão ser congeladas. Após a coleta, as amostras deverão ser armazenadas em potes de plástico (polietileno) descontaminados. Depois de fechados, os recipientes deverão ser envoltos em sacos plásticos.

Quando for utilizada draga/pegadores de fundo, o material para análise deverá ser retirado da parte central do sedimento, no intervalo máximo de até 5 cm abaixo da camada mais externa. A retirada das amostras deve ser feita o mais rápido possível, pois há o risco de oxidação e consequente alteração da amostra quanto maior a sua exposição. A cada amostra retirada, anotar a profundidade e descrever características importantes tais como: (cor, textura, odor, presença ou não de óleo, iridescência, etc.).

- Critérios para aceitação das amostras:

Considera-se aceitável uma amostra de sedimento, aquela coletada nas seguintes condições:

- Pleno atendimento dos procedimentos de utilização dos amostradores constantes;
- Certeza do correto funcionamento do amostrador;
- Descartar amostras no caso de suspeita de contaminação do amostrador durante o seu içamento ou durante a retirada da amostra para transferência para os recipientes de armazenamento;
- As amostras devem estar devidamente identificadas, bem como todos os dados referentes a sua retirada registradas em um controle de bordo.

- Número de réplicas:

Nos estudos rotineiros de monitoramento ou caracterização do ambiente marinho, via de regra, apenas uma única amostra de sedimento superficial de interesse é suficiente para cada estação de amostragem. Somente quando claramente especificado, a depender da finalidade da coleta, serão necessárias coletas de amostras em duplicata e triplicata.

- Controle de qualidade:

Deverão ser obtidas amostras como “Branco de Campo” para avaliação do ambiente aonde as amostras são coletadas/transferidas. Em um determinado período, preferencialmente a cada dois dias, um frasco de coleta (um pote de plástico de polietileno) deverá ser aberto e exposto ao ambiente onde é feita a retiradas amostras dos coletores e em seguida fechado. Estas amostras deverão ser identificadas como “Branco de Campo”, datadas e ter seu registro efetivado no relatório de bordo.

- ❖ Metais totais e terras raras

Deverá ser usado parte de sedimento liofilizado, obtido através de coleta de sedimentos, detalhada no item de sedimentos superficiais.

- ❖ Compostos orgânicos

As amostras para análise de Hidrocarbonetos (F1), Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (F2), Biomarcadores Lipídicos (F3), Pesticidas e bifenilas policloradas, Fenol, Ácidos graxos e lipídeos totais e Éter-aminas e aminas aromáticas serão coletados um total de 1000g de sedimento com amostrador do tipo busca fundo (Van Veen) em marmitas de alumínio hermeticamente fechadas. Desse total coletado, 200g irão para determinação de hidrocarbonetos alifáticos (F1), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (F2) e biomarcadores lipídicos (F3); 200g para pesticidas; 200g para PCBs; 200g para fenóis e 200g para Éter-aminas e Aminas aromáticas. As amostras deverão ser preservadas sob refrigeração a 4 °C até seu pré-processamento. As subamostras serão coletadas com o auxílio de espátula de metal raspando os centímetros superficiais contendo a lama alaranjada que representa o rejeito. As amostras serão liofilizadas, armazenadas em potes de

alumínio ou vidro (calcinado), devendo conter, no mínimo, 10g de amostra seca, que, posteriormente serão congeladas e enviadas para o laboratório de análise.

❖ Elementar (particulado)

- Carbono

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa. A análise elementar de carbono nas amostras de sedimento será realizada por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha). Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão preparados para terem concentrações similares às amostras analisadas. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises. Os resultados serão apresentados como porcentagem de carbono nas amostras.

- Nitrogênio

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa.

A análise elementar de nitrogênio nas amostras de sedimento será realizada por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO Analyser (FLASH HT Plus, Thermo, Alemanha). Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão preparados para terem concentrações similares às amostras analisadas. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises. Os resultados serão apresentados como porcentagem de nitrogênio nas amostras.

❖ Isótopos (Particulado)

- Carbono

Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa.

As análises das razões isotópicas de carbono (C) nas amostras de seston serão realizadas com um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer – IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C e R é a razão correspondente $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição isotópica similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizados serão p.ex. IAEA-CH3 (Celulose), IAEA-600 (cafeína). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no calcário de Viena Pee Dee Belemnite (V – PDB). Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas.

- Nitrogênio

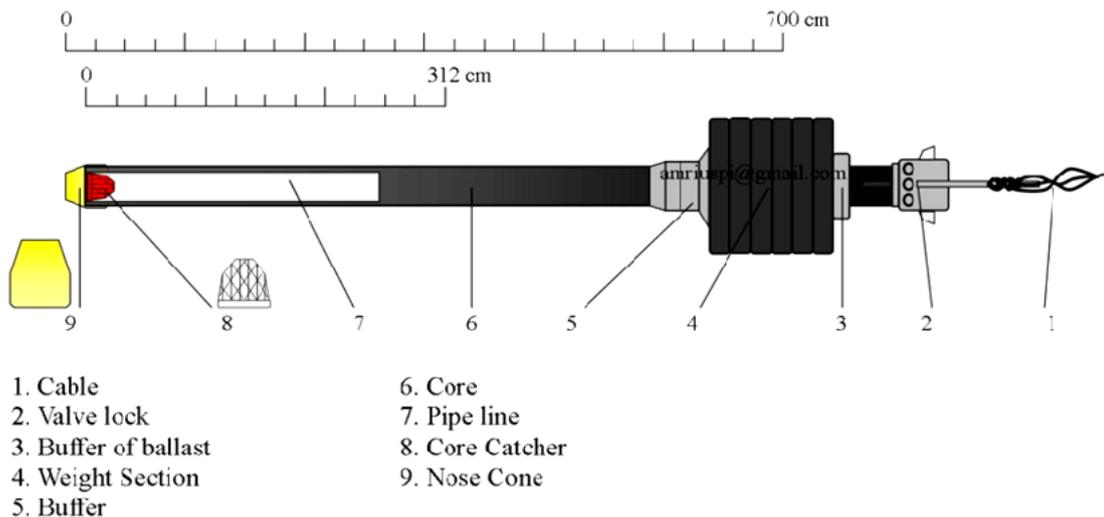
Amostras de 100g sedimento serão coletadas em potes plásticos previamente lavados com água destilada. Essas amostras serão transportadas em cooler com gelo reciclável para o laboratório e deverão ser secas em estufa a 50°C e acondicionadas em potes plásticos ou tubos falcon. Antes da análise as amostras serão transferidas em capsulas de estanho, e fechadas utilizando uma prensa.

As análises das razões isotópicas de nitrogênio (N) nas amostras de seston serão realizadas com um espectrômetro de massa de razão isotópica (Isotope Ratio Mass Spectrometer – IRMS, Delta V, Thermo, Alemanha), que mede a composição isotópica. Os resultados são então expressos pela unidade padrão δ como: $\delta X = [(R \text{ substrato} - R \text{ produto}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{15}N e R é a razão correspondente $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Antes das análises, o equipamento será calibrado com materiais de referência padrão. Esses padrões serão selecionados por terem uma composição isotópica similar às amostras analisadas. Os materiais de referência (ou padrão externo) utilizados serão p.ex. IAEA N2 (sulfato de amônio) e IAEA-NO3 (nitrato de potássio). Os valores delta finais são expressos em relação aos padrões internacionais baseados no nitrogênio atmosférico, N2. Será utilizado ainda um padrão interno, a caseína, medido a cada dez amostras analisadas. Esse padrão interno é utilizado para corrigir pequenos erros que podem ocorrer durante as análises isotópicas.

5.3.3 Matriz sedimento testemunho

As coletas de sedimento testemunho serão feitas com um amostrador de fundo do tipo Gravity Core (Figura 18).

Figura 18. Diagrama do Gravity Core (U. Amri et al. 2015).



É importante salientar que este equipamento apresenta melhor acurácia em substrato lamoso. Para evitar contaminação química, nenhuma parte do sedimento testemunho nem da espuma floral podem ser manuseados com qualquer tipo de metal e nem entrar em contato com óleo ou combustível. Para efetuar a montagem antes do lançamento, é preciso inserir um cano PVC (50 mm de diâmetro) de 1 m de comprimento dentro do Gravity Core. Este cano deverá conter em sua extremidade o Core Catcher. Em seguida, deverá ser fechado com o Nose Cone. Após o recolhimento do Gravity Core, o cano PVC deverá ser retirado do equipamento e vedado com espuma floral (hidratada) e uma tampa (CAP para 50 mm de diâmetro). Para hidratar a espuma, corte-a com o próprio tudo de PVC (para ficar da largura correta do tubo) e coloque-a em um balde com água deixando a espuma absorver água naturalmente e uniformemente durante, no mínimo, duas horas. É importante não afundar a espuma floral dentro do balde, pois ficarão áreas secas em seu interior. Para evitar contaminação do sedimento com a espuma, deverá ser colocado um filme plástico entre os dois. Após coleta, o testemunho deverá ser identificado com a etiqueta padrão de coleta da Rede Rio Doce Mar e sinalizado onde se encontram o topo e a base. Os testemunhos amostrados deverão ser armazenados em caixas refrigeradas até chegarem ao laboratório de processamento.

A coleta do testemunho de sedimento lacustre será feita anualmente com amostrador Uwitec hammer corer com tubos de 120 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro. Será coletado um único

testemunho em cada ecossistema lacustre. As amostras serão coletadas nas estações amostrais previstas para as matrizes coluna d'água e sedimento. Os testemunhos de sedimento serão selados com tampões para transporte até o laboratório onde serão fatiados a cada 1 cm até 15 cm, em 2 cm até 25 cm e a cada 5 cm até o final. O acondicionamento das amostras será feito em potes de polietileno com tampa e volume de 250 mL. Cada amostra será identificada em relação à estação amostral, data e profundidade do core. Alíquotas das amostras serão posteriormente encaminhadas para análises de granulometria, matéria orgânica, nutrientes e metais totais.

5.3.4 Matriz biota

❖ Fitoplâncton

Para o monitoramento do fitoplâncton marinho, amostras de água serão coletadas em cada estação amostral, através de arrasto de rede de plâncton (análise qualitativa) e de garrafa (análise quantitativa e de pigmentos fotossintéticos).

Logo, ao fim de cada amostragem serão obtidos:

➤ Para cada estação com três (3) profundidades (superfície, meio e fundo): 1 amostra qualitativa armazenada em frasco polietileno tereftalato (PET), cilíndrico âmbar (150 mL), com fixador (1 frasco de REDE com lugol neutro); 1 amostra qualitativa depositada em frasco retangular de polietileno de 250 mL, também com solução fixadora (1 frasco de REDE com formalina neutralizada); e 3 amostras quantitativas, uma para cada profundidade, armazenadas em frascos retangulares de polietileno de 250 mL com fixador previamente depositado (3 frascos de GARRAFA com formalina neutralizada). Ademais, coletar-se-á um volume de 6 litros destinada à análise de pigmentos, sendo 2 litros por profundidade (1 litro por réplica) resultando em 6 filtros já processados provenientes da duplicata de cada uma das três (3) profundidades. No Parque Nacional Marinho de Abrolhos, todavia, serão coletados 12 litros de água e filtrados 2 litros por réplica resultando em 6 filtros já processados (Quadro 11).

➤ Para os pontos com superfície e fundo: 1 frasco escuro de 150 mL, 3 frascos de polietileno de 250mL (2 garrafas e 1 rede), 2 coletores escuros de 2 litros para pigmentos (exceto Abrolhos onde serão filtrados 2L por réplica – logo 4 coletores de 2L) ou 4 filtros já processados.

Finalizadas todas as amostragens, uma ficha de “check list de amostragens – projeto Rede Rio Doce Mar” será preenchida para certificação de que todas as amostragens referentes ao ponto foram realizadas.

Quadro 11. Materiais que serão utilizados por estação amostral com 3 profundidades.

| Itens | Análise quantitativa (Garrafa) | Análise qualitativa (Rede) | Pigmentos (Garrafa) |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------|
| Frascos cilíndrico âmbar 150 mL | Não se aplica | 1 | Não se aplica |
| Frascos polietileno de 250 mL | 3 | 1 | Não se aplica |
| Frascos escuros 2L | Não se aplica | Não se aplica | 3 (4-6 em Abrolhos) |
| Nalgon de 1L (pontos Abrolhos) | 3 | Não se aplica | Não se aplica |

Para os procedimentos realizados serão empregados o uso de luvas adequadas a cada situação. Luvas descartáveis na filtragem de clorofila e luvas pigmentadas em situações de manuseio de cordas, engradados e demais objetos pesados ou que exigem esforço físico.

- Amostras Qualitativas

Para a coleta das amostras qualitativas serão utilizados três (3) Redes de plâncton de 60 µm com aro, corda com marcação de metro em metro e copo coletor rosqueado, frascos de polietileno de 250 mL com batoque, contendo 12,5 mL de formaldeído 40% neutralizado com hexametilenotetramina (100g/L), totalizando 2% no volume final na amostra, frascos escuros de 150 mL com 1 mL (30 gotas) de solução de lugol neutro, Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) dos reagentes utilizados para fixação das amostras e 1L de formaldeído 40% neutralizado com hexametilenotetramina (100g/L) (sobressalente). Esta amostragem será realizada preferencialmente durante o dia a fim de evitar excesso de zooplâncton na amostra.

Para a amostragem será utilizada uma das redes de plâncton (duas serão sobressalentes) e serão realizados os seguintes procedimentos:

- Conferência se o copo está bem rosqueado antes de lançar a rede ao mar e se a rede está bem presa à corda de lançamento;
- Arrasto em velocidade inferior a 2 nós por 5 minutos;
- Assim que recolhida a rede e aguardado o material filtrar até caber no copo, a amostra será transferida para um béquer de polietileno graduado de 1 L, homogeneizada por agitação, em seguida passada para o frasco de polietileno de 250 mL contendo 12,5 mL de formaldeído neutralizado com hexametilenotetramina (100g/L) e frascos escuros de 150 mL com 1 mL (30 gotas) de solução de lugol neutro previamente identificados com grafia “REDE”, sem enchê-lo completamente. Caso houver transbordo, será descartada e recolhida uma nova amostra;
- A amostra deverá ser identificada a lápis e em fita crepe. Será adicionada a fita o código da amostra, ponto amostral, campanha a qual pertence, data e horário da coleta;

- Os frascos serão armazenados no engradado e em local fresco, arejado e sombreado para evitar evaporação das amostras contendo fixador;
- A rede deve ser cuidadosamente lavada sem o copo após cada coleta;
- O copo da rede será lavado e o conjunto rede e copo serão guardados;
- A conexão da tampa e frasco será vedada com papel alumínio e parafilme.
- Amostras Quantitativas

Para a coleta das amostras quantitativas do fitoplâncton será utilizado frasco de polietileno 250 mL com batoque, contendo 12,5 mL de formaldeído 40% neutralizado com hexametilenotetramina (100g/L), totalizando solução de 2% no volume final da amostra.

Esta amostragem será realizada somente durante o dia através dos seguintes procedimentos:

- Água in natura será recolhida em frascos de 250 mL (com exceção dos pontos de Abrolhos que serão coletados em frascos nalgon de 1L). Os frascos estarão identificados com a grafia “GARRAFA” e a coleta será em superfície, meio e fundo da coluna d’água, retirada da garrafa lançada pelo Laboratório de Geoquímica Ambiental (LabGAm). Caso ocorra transbordo, será realizado o descarte e uma nova amostra será recolhida;
- A conexão da tampa e frasco será vedada com papel alumínio e parafilme;
- A amostra será identificada a lápis e em fita crepe. Será adicionada a fita o código da amostra, ponto amostral, campanha ao qual pertence, data, horário da coleta e profundidade.
- Pigmentos (Clorofila-a e Feopigmentos)

Será utilizado 3 ou 6 (Abrolhos) frascos escuros 2L (14-17 sobressalentes), porta-filtro, filtros analíticos AP40 em microfibras de vidro da Millipore Corporation® (retenção nominal de 0,7 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro), 02 béqueres de polietileno graduado de 1 L, 01 planilha para anotação das informações das amostras filtradas, 06 seringas estéreis de polietileno, graduadas (60 mL), papéis alumínio (tamanho: 7x7cm), 02 pinças de metal de ponta lisa estéreis, 01 pisseta com água destilada, 01 pisseta ou spray com álcool 70%, 02 frascos escuros com sílica-gel para manter os filtros sem umidade, 01 refrigerador ou 01 caixa de isopor com gelo, 01 frasco de MgCO₃, 03 gelos artificiais ou gelo azul e 03 canetas marcadoras à prova d’água, para escrever e marcar vidro, plástico e papel.

Esta amostragem será feita somente durante o dia. Caso não haja tempo entre estações para as filtrações de clorofila, as garrafas serão armazenadas em refrigeração (não podem congelar) e processadas no mesmo dia à noite. Serão realizados os seguintes procedimentos:

- Identificação do frasco escuro de 2L com informação do ponto, profundidade, hora da coleta. Deverá ser preenchida uma ficha de campo referente a pigmentos;
- Coleta da água in natura da garrafa recolhida pelo Laboratório de Geoquímica Ambiental (LabGAm) e transferência para o frasco escuro de 2L (2 frascos de 2L por profundidade nos pontos

de Abrolhos). O frasco será imediatamente levado para a “área úmida” designada a atividade, abrigada da luz;

- Os passos seguintes serão para a filtração imediata, para tal devem ser homogeneizadas por agitação, e realizadas. Do contrário a amostra será guardada em refrigeração até a filtragem;
- Deverá ser verificado se o anel de vedação (O-ring) está dentro do porta-filtro (Figura 19);

Figura 19. Anéis de vedação ou o-ring's (seta vermelha): lado esquerdo (preto) e de silicone transparente, deslocado no lado direito. Fonte: Laboratório de Fitoplâncton (2018).



- Caso tenha sido utilizado em um ponto anterior, será lavado com água destilada com atenção para não perder o anel de vedação. Em seguida o filtro de fibra de vidro será manipulado com a pinça de ponta redonda. A pinça deverá estar limpa (se tiver dúvida esterilizada com álcool 70%). O filtro será colocado com a parte quadriculada para baixo e a parte rugosa para cima;
- O porta-filtro deverá ser fechado com cuidado;
- A amostra homogeneizada por agitação;
- A seringa será enchida com a amostra;
- O porta-filtro acoplado e em seguida a filtração será realizada a uma pressão constante;
- O porta-filtro deve ser retirado da seringa e os passos 6 e 7 devem ser repetidos até que a filtração se torne difícil (filtro saturado) ou até o volume de 1 L;
- Caso ao fim da filtragem fique água no porta-filtro, puxe um pouco de ar na seringa, acople o porta-filtro, e passe um pouco do ar suavemente;
- O porta-filtro deverá ser retirado da seringa;
- Deverá abri-o, sempre com cuidado para não perder o anel de vedação. Em seguida, adicionar uma gota da solução de MgCO₃ no filtro ao término da filtração para evitar a acidificação da clorofila;
- Com a pinça (sem tocar na amostra) o filtro deverá ser retirado e dobrado, colocando no centro do papel alumínio, com lado fosco para dentro, fechando o envelope;
- Dados como código da amostra, ponto amostral, campanha ao qual pertence, volume filtrado, data, horário da coleta e profundidade serão anotados em fita crepe, preferencialmente dando uma volta em todo envelope de papel alumínio;
- O procedimento será repetido, as amostras de pigmento serão em duplicata;

- As duplicatas serão juntadas com fita crepe em um único pedaço de papel alumínio (referente à campanha e dia da coleta) incluindo as profundidades de uma mesma estação amostral e depositadas em recipiente hermético, plástico e de cor âmbar (opaco), contendo sílica gel (cor azul indica condição boa para uso, ou seja, está isenta de umidade), previamente desidratada.
- Os filtros serão conservados em refrigeradores (entre 4°C a 10°C, sem congelamento);
- A ficha de “Amostragens para pigmentos” será preenchida.

❖ Ictioplâncton

O ictionêuston será coletado trimestralmente e semestralmente utilizando a rede neustônica. Esta rede é constituída por duas redes de 400 cm de comprimento presas a duas bocas retangulares de 15 cm de altura por 30 cm de largura cada, sustentadas por uma armação tipo catamarã sendo arrastadas horizontalmente. A rede superior fica na interface emersa e submersa capturando os organismos das camadas superficiais (0~15 cm de profundidade), enquanto que a rede inferior fica totalmente submersa durante todo o tempo, coletando os organismos das camadas subsuperficiais (15~30 cm de profundidade). As malhas das duas redes são de 500 µm de abertura. Os arrastos serão feitos em círculos de modo que a rede não fique na esteira do navio.

O ictioplâncton será coletado trimestralmente e semestralmente por arrastos oblíquos com rede bongô, desde próximo ao fundo até a superfície, segundo as recomendações de Smith & Richardson (1977). A rede bongô é formada por duas redes cônico-cilíndricas, com 60 cm de diâmetro e aberturas de malha de 500 µm.

A velocidade de arrasto será de dois nós e o tempo de arrasto será de 10 minutos. Logo após a coleta, as amostras serão fixadas em solução de formaldeído diluído a 4% e tamponado com tetraborato de sódio à razão de 20 g.L⁻¹. O volume de água filtrada será estimado através do fluxômetro, previamente aferido, preso na boca das redes utilizadas. O volume da rede neustônica superior será estimado através da superfície da área arrastada pela rede.

Será necessário que o barco seja equipado com contador de cabo para realização do cálculo do volume de água filtrada pela rede neustônica superior e para a determinação da profundidade de arrasto da rede bongô.

❖ Zooplâncton

- Preparação do material de coleta
 - Solução de preservação das amostras

Para o preparo de solução preservante a partir de formol (formaldeído CH₂O) e bórax (tetraborato de sódio - Na₂B₄O₇) para fixação e preservação das amostras de zooplâncton deve-se realizar o procedimento em laboratório equipado com capela, pois o formaldeído é volátil e perigoso à saúde, sendo potencialmente carcinogênico em humanos, todo cuidado deve ser tomado durante a manipulação dessa substância. Utilizar luvas, óculos e máscara com filtro para vapores orgânicos.

→ Em um béquer adicione 20 g de bórax em 1000 ml de formol (PA).

→ Utilizar um agitador magnético para acelerar a dissolução do bórax.

➤ Preparo dos Frascos com Formol

→ Separar um número desejado de frascos (500 ml).

→ Com uma pipeta e uma pera na extremidade, preencher o frasco com solução de formaldeído (PA) neutralizado (solução estoque).

→ O volume da solução estoque pode ser obtido pela fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ onde:

C_1 = Concentração da solução estoque = 100 % (PA)

V_1 = Volume necessário da solução estoque = 20ml

C_2 = Concentração da solução final= 4 %

V_2 = Volume desejado da solução final =500 ml

$100 \times V_1 = 4 \times 500 \longrightarrow V_1 = 4 \times 500 / 100 \longrightarrow V_1 = 20 \text{ ml (para frascos de 500 ml)}$

• Material necessário para o embarque

➤ Insumos

Quadro 12. Lista de insumos específicos para realização das coletas (semestral, trimestral e mensal) de zooplâncton.

| Quantidade | | | | Unidade | Insumo |
|------------|------------|--------|-------|---------|--|
| Semestral | Trimestral | Mensal | Total | | |
| 90 | 80 | 30 | 2000 | Unidade | Pote plástico de 500 ml com tampa de rosca |
| 18 | 6 | 16 | 250 | Litro | Formaldeído |
| 0,5 | 0,5 | 0,5 | 6 | Quilo | Tetraborato de Sódio |
| 2 | 2 | 2 | 2 | Unidade | Balde |
| 2 | 2 | 2 | 2 | Unidade | Pisseta |
| 2 | 2 | 2 | 2 | Unidade | Pinça |
| 1 | 1 | 1 | 16 | Caixa | Luva nitrílica |
| 2 | 2 | 2 | 2 | Unidade | Rede WP2 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | Unidade | Rede Bongo |
| 2 | 2 | 2 | 2 | Unidade | Rede cilindro-cônica |
| 1 | 1 | 1 | 1 | Unidade | Defletor |
| 4 | 4 | 4 | 4 | Unidade | Mensageiro |
| 2 | 6 | 6 | 6 | Unidade | Fluxômetro |

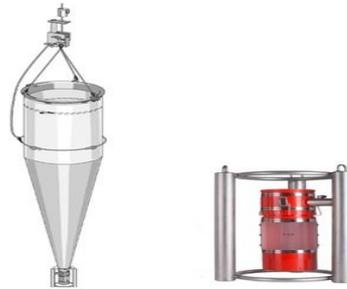
Quadro 13. Lista de insumos comuns utilizados para coleta de zooplâncton.

| Insumo | Tamanho | Material | Estimativa Zooplâncton |
|-----------------------------|---------|-------------|------------------------|
| Cabo | 12 mm | Polietileno | 50 m |
| | 6.5 mm | Aço | 70 m |
| Manilha | 8 | Inox | 2 unidades |
| | 10 | | 2 unidades |
| Destorcedor de cabo | 8 | Inox | 2 unidades |
| | 10 | | 2 unidades |
| Mangueira | 3/4" | - | 3 m |
| Braçadeiras (tairap) | 3.6/300 | - | 1 pacote |
| | 4.8/400 | | 1 pacote |
| Caixa | 70 L | Térmica | 2 unidades |
| Engradados | - | - | 6 unidades |
| Patesca / Roldana | - | - | 2 unidades |
| Contador de cabo / Odometro | - | - | 2 unidades |
| Inclinômetro | - | - | 2 unidades |
| Prancheta | - | - | 2 unidades |
| Caneta Permanente | - | - | 4 unidades |
| Lápis | - | - | 4 unidades |
| Borracha | - | - | 4 unidades |
| Holofote Portatil | - | - | 2 unidades |
| Lanterna | - | - | 2 unidades |

- Material necessário para coleta do zooplâncton:

Arrasto vertical: Rede de plâncton tipo WP-2 de fechamento com malha de 200 micrômetros; Fluxômetro; Cabo de aço; Contador de cabo; Destorcedor de cabo; Inclinômetro e Mensageiro.

Figura 20. Sistema de rede de plâncton tipo WP-2 com mecanismo de fechamento. Rede com abertura de malha de 200 micrômetros.



Arrasto oblíquo: Rede tipo Bongo (duas redes com abertura de malha de 200 micrômetros); Fluxômetro; Defletor e Cabo de aço.

Figura 21. Rede de plâncton tipo bongo com duas redes de abertura de malha de 200 micrômetros e defletor.



- Preparação para a coleta do zooplâncton

Antes de iniciar cada uma das campanhas (mensais, trimestrais e semestrais) as seguintes verificações devem ser feitas:

- Fluxômetro: verificar se está funcionando corretamente, inserindo água e girando o hélice, para perceber o conta-giros funcionando;
- Redes de plâncton: verificar a limpeza das redes e se estão bem presas ao aro; verificar as amarrações de cabos ao aro; verificar se o copo está limpo, sem material dentro ou preso à rede;
- Frascarias: verificar se o quantitativo de frascos para as coletas estão de acordo com cada campanha (mensal, trimestral e semestral);
- Etiquetas: verificar se há a quantidade suficiente de etiquetas, etiquetas de papel vegetal;

- Soluções fixadoras: verificar se há quantidade suficiente de soluções fixadoras e já deixar as soluções nos frascos;
- Cadeias de custódia: verificar se há cadeias de custódia suficiente para registrar todas as amostras.
- Rotina de campo

A coleta do zooplâncton será realizada a noite (entre 18 horas e 6 horas), por meio de arrastos verticais estratificados (Figura 20) com rede do tipo WP-2 (abertura de malha de 200 micrômetros) e por meio de arrastos oblíquos com rede do tipo bongo. Um fluxômetro mecânico deverá ser acoplado na abertura da boca das redes. O fechamento da rede WP-2 na profundidade desejada será feito do por meio de um mensageiro. Em profundidades superiores a 5 metros e inferiores a 30 metros deverão ser feitos 2 arrastos:

- 1 arrasto do fundo até metade da coluna d'água;
- 1 arrasto da metade da coluna d'água até a superfície.
- Em profundidades superiores a 30 metros deverão ser feitos 3 arrastos:
 - 1 arrasto do fundo até 30 metros;
 - 1 arrasto de 30 a 15 metros da coluna d'água até a superfície;
 - 1 arrasto de 15 metros até a superfície.

Figura 22. Amostragem da coleta de zooplâncton em até 30 metros de profundidade e superior a 30 metros.

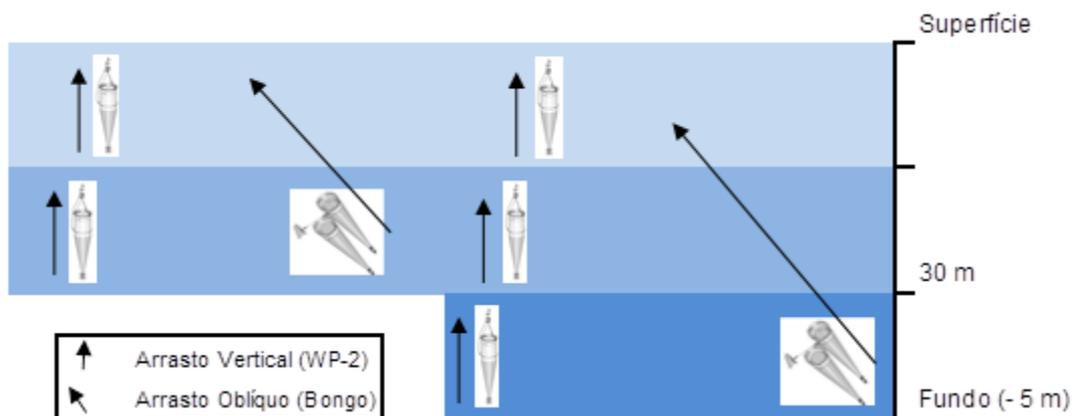


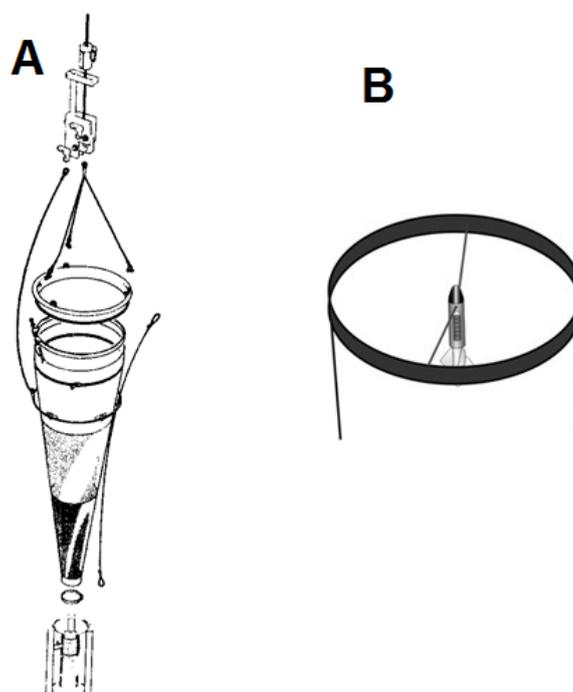
Tabela 7. Relação do número de lançamentos de rede, tempo de arrasto e quantidades de amostras por ponto para cada tipo de amostragem (vertical e oblíquo).

| Rede | Tipo de arrasto | Lançamentos/ponto | Tempo de arrasto/ponto | Amostras/ponto |
|-------|-----------------|-------------------|------------------------|----------------|
| WP-2 | vertical | 2 ou 3 | 7 a 10 minutos | 2 ou 3 |
| Bongo | oblíquo | 1 | 5 minutos | 1 |

- Diretrizes para a coleta de zooplâncton por arrasto vertical

Preparar a rede WP-2: colocar o copo, se certificar de que todas as manilhas estejam fechadas e que o sistema de fechamento da rede esteja com o mensageiro acoplado e travado (Figura 23.A). O fluxômetro deve ser preso a boca da rede com abraçadeiras de forma a ficar localizado no centro da boca da rede (Figura 23.B).

Figura 23. Amostragem da coleta de zooplâncton em até 30 metros de profundidade e superior a 30 metros.



Verificar a profundidade do local, a fim de saber quantos estratos serão amostrados na coluna d'água. Preencher os dados da estação e o número inicial do fluxômetro na planilha de amostragem de zooplâncton.

A rede, presa num cabo, é colocada na água e o primeiro estrato amostrado sempre será o mais profundo. Lembrando de iniciar o arrasto 5 metros acima da profundidade local. Um metro antes da

rede WP-2 atingir a profundidade desejada para finalizar o arrasto, o mensageiro é lançado, para fechamento da rede. Logo após recolher a rede ao deck, com o cuidado de posicionar o copo coletor em pé, anota-se o número final do fluxômetro.

Posiciona-se a rede na vertical para lavagem, sempre jogando o jato de água do lado de fora da rede, para evitar contaminação da amostra. Desacopla-se o copo coletor da rede e transfere-se a amostra para um pote plástico de 500 ml etiquetado contendo formol 4% tamponado. Caso seja necessário, completa-se o volume do pote plástico com água filtrada do local. Veda-se o pote plástico com fita isolante.

- Diretrizes para a coleta de zooplâncton por arrasto oblíquo

Para os arrastos oblíquos de zooplâncton serão utilizados rede do tipo Bongo, com duas malhas de 200 micrômetros, contendo um fluxômetro mecânico na abertura da boca de uma das redes. Preparar a rede bongo: colocar os copos, se certificar de que todas as manilhas estejam fechadas. O fluxômetro deve ser preso a boca de uma rede com abraçadeiras de forma a ficar localizado no centro da boca da rede.

Verificar a profundidade do local, com a finalidade de evitar que a rede toque o fundo do mar. Preencher os dados da estação e o número inicial do fluxômetro na planilha de amostragem de zooplâncton. A rede, presa num cabo, é colocado na água pela popa com o barco parado e então começa-se o arrasto com a velocidade de 1 nó, durante 5 minutos, sempre que possível contra a corrente.

Logo após recolher a rede ao deck, com o cuidado de posicionar o copo coletor em pé, anota-se o número final do fluxômetro. Posiciona-se a rede na vertical para lavagem, sempre jogando o jato de água do lado de fora da rede, para evitar contaminação da amostra.

Desacopla-se o copo coletor da rede e transfere-se a amostra para um pote plástico de 500 ml etiquetado contendo formol 4% tamponado. Caso seja necessário, completa-se o volume do pote plástico com água filtrada do local. Veda-se o pote plástico com fita isolante.

Figura 24: Modelo de etiquetas para a coleta de zooplâncton por arrasto vertical e oblíquo

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Monitoramento Rio Doce - Mar | |
| ZOOPLÂNCTON - Vertical | |
| Ponto: | (Frasco: /) |
| Profundidade: | |
| Setembro/18 | |
| | |
| Monitoramento Rio Doce - Mar | |
| ZOOPLÂNCTON - Oblíquo | |
| Ponto: | |
| Profundidade: | |
| Setembro/18 | |

❖ Bentos marinho de substrato inconsolidado

As informações sobre a localização das amostras que serão coletadas para análise de bentos de substrato inconsolidado na plataforma continental são apresentadas no Quadro 14 e na Figura 17.

Quadro 14. Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem a serem monitorados na Foz do Rio Doce e região costeira adjacente (costa do Espírito Santo e sul da Bahia).

| Localidade | Lat | Long |
|-----------------|------------|------------|
| Guarapari | -20,580440 | -40,389720 |
| Guarapari | -20,619110 | -40,368610 |
| Vitória | -20,262193 | -40,212487 |
| Costa das algas | -19,977583 | -40,108306 |
| Costa das algas | -19,972194 | -40,048111 |
| Costa das algas | -19,973833 | -39,915306 |
| Costa das algas | -19,932611 | -39,782583 |
| Costa das algas | -20,052502 | -40,086248 |
| Costa das algas | -20,093839 | -39,946339 |
| Costa das algas | -20,151074 | -39,844587 |
| Costa das algas | -19,920875 | -40,101465 |
| Costa das algas | -20,001464 | -40,146739 |
| Costa das algas | -20,037460 | -40,173072 |
| Costa das algas | -20,143600 | -39,886600 |
| Costa das algas | -20,048200 | -39,844700 |
| Costa das algas | -20,008200 | -40,034900 |
| Costa das algas | -19,937900 | -39,844000 |
| Costa das algas | -20,059200 | -39,951800 |

| Localidade | Lat | Long |
|-----------------|------------|------------|
| Foz do Rio Doce | -19,507056 | -39,683611 |
| Foz do Rio Doce | -19,605417 | -39,689250 |
| Foz do Rio Doce | -19,624583 | -39,729278 |
| Foz do Rio Doce | -19,686389 | -39,769056 |
| Foz do Rio Doce | -19,714556 | -39,736972 |
| Foz do Rio Doce | -19,757861 | -39,682778 |
| Foz do Rio Doce | -19,840528 | -39,886139 |
| Foz do Rio Doce | -19,742333 | -39,841028 |
| Foz do Rio Doce | -19,764722 | -39,959694 |
| Foz do Rio Doce | -19,823330 | -39,593330 |
| Degredo | -19,308584 | -39,671964 |
| Barra Nova | -18,958668 | -39,701499 |
| Barra Nova | -18,961848 | -39,434400 |
| Itaúnas | -18,408001 | -39,658504 |
| Itaúnas | -18,478489 | -39,345227 |
| Abrolhos | -17,991722 | -38,697111 |
| Abrolhos | -17,884139 | -38,759722 |
| Abrolhos | -17,934861 | -39,227222 |
| Abrolhos | -17,981722 | -38,715083 |
| Abrolhos | -18,020278 | -38,837722 |

As amostras serão coletadas em dois períodos:

- Amostragem Trimestral:

Serão concentradas nos pontos amostrais em Vitória, na Área de Proteção Ambiental Costa das Algas e Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz, na Foz, em Degredo, em Barra Nova e em Itaúnas (Figura 14 e Quadro 14).

- Amostragem Semestral:

Serão realizadas nos mesmos pontos da amostragem trimestral adicionando-se as amostras em Abrolhos e em Guarapari (Figura 17 e Quadro 14).

- Mobilização em terra para embarque

Separação de Material:

- amostradores box core e van veen com capacidade de 3L;
- etiquetas impressas conforme o padrão do projeto RRDM especificamente para biota;
- papel vegetal para etiquetas das amostras;
- lápis 2b, borracha, apontadores, caneta permanente;

- béquer plástico;
- tabela com informações sobre os pontos amostrais para registros de outros dados importantes observados em campo;
- caderno de campo para registros de todos os acontecimentos, procedimentos e amostras coletadas;
- equipamento fotográfico para registro das amostras;
- álcool 70%;
- bandejas para receber o sedimento do amostrador e manipulação das amostras;
- pás de plástico para manipulação das amostras;
- material de dissecação (pinças, espátulas e bisturis) para manipulação das amostras;
- luvas para manipulação das amostras;
- baldes de 10L presos à corda para coleta de água do mar para limpeza da área de trabalho;
- elásticos para fechamento dos sacos plásticos com amostras;
- recipientes específicos para as amostras de sedimentologia e geoquímica que serão feitas a partir do mesmo amostrador;
- 2 bombonas para acondicionamento e transporte das amostras em sacos plásticos com álcool;
- 2 caixas para acondicionamento e transporte das amostras em potes plásticos.

Na data de embarque, 4 pesquisadores, 2 que irão efetivamente embarcar e 2 que irão auxiliar no transporte e organização do material de coleta, irão de carro a partir do Laboratório de Malacologia do Departamento de Ciências biológicas da UFES, campus Goiabeiras (Av Fernando Ferrari, 514, Vitória, ES), até o ponto de embarque, no Rio Piraque Açu, em Santa Cruz, Aracruz, ES.

A coleta das amostras deverá ser realizada em substrato inconsolidado por meio do lançamento de amostrador tradicional boxcorer ou van Veen, apropriado para este ambiente, com volume mínimo de 3 litros.

Cada amostra receberá uma etiqueta com o código do local de coleta, data, profundidade, número sequencial correspondente, observação sobre local/condição de coleta, código da expedição (coletor), seguindo o padrão estabelecido para o projeto RRDM. Junto com o pesquisador haverá uma tabela das amostras para registros em campo, onde serão anotadas todas estas informações além de outras descrições e informações importantes. Toda amostra acondicionada deverá ser registrada em caderno de campo, conforme sua etiqueta, para que se tenha absoluto controle do material coletado.

Atenção:

- A manipulação das amostras deverá sempre ser feita de acordo com o protocolo específico das demais abordagens que utilizarão a mesma pegada de amostrador, como sedimentologia e geoquímica.

- Para cada pegada, assim que retirado da água, o amostrador deverá ser posicionado fechado dentro da bandeja de plástico e seguidos os passos descritos para cada amostragem, além de bentos, como, por exemplo, densidade, geoquímica e sedimentologia.
- Estas amostras deverão ser retiradas antes da adição de álcool 70% para preservação da biota.
- Amostras para bentos

No momento da chegada do amostrador a bordo, deverá ser apoiado no interior das bandejas plásticas e retirada as alíquotas para as outras abordagens. Na sequência, as amostras deverão ser transferidas para sacolas plásticas dispostas uma dentro da outra (duplas) com a etiqueta colocada entre elas. Caso o amostrador utilizado seja o van Veen, poderá ser aberto diretamente dentro das sacolas plásticas, apoiadas no interior das bandejas e fotografadas junto com suas amostras (Figura 25). Deverá, então, ser adicionado álcool 70% nestas sacolas até cobrir o volume de sedimento coletado e as mesmas fechadas com elástico (de dinheiro) de forma a impedir a perda do líquido conservante. Para o fechamento deste saco plástico com o formol será necessário retirar o excesso de ar, pressionando desde o material indo em direção à sua abertura (Figura 26 A). Na sequência, fechá-lo, fazendo dobras estreitas a partir desta abertura até cerca de metade do saco, sem pressionar a amostra (Figura 26 B e C). Neste ponto, dobrar as duas extremidades em direção ao meio, colocando pelo menos dois elásticos para fechar (Figura 26 D, E e F). Estes sacos serão mantidos em bombonas ou caixas plásticas.

Estas amostras serão enviadas, em um primeiro momento para a Base Oceanográfica, em Aracruz, ES, onde serão processadas para separação da macrofauna. Depois desta separação, as amostras serão encaminhadas para os três laboratórios envolvidos no projeto, a saber: UFES, Goibeiras, Vitória, ES; UFES Alegre, ES e UFRB, Cruz das Almas, BA. Nestes laboratórios será feita a triagem, quantificação e identificação dos organismos para produção dos resultados esperados no Projeto RRDM.

Figura 25. Posicionamento e abertura da draga no interior do saco plástico; C - retirada do excesso de sedimento com espátula; D - registro fotográfico da amostra.



Figura 26. A - retirada do excesso de ar do saco plástico; B e C - dobras estreitas a partir da abertura até cerca de metade do saco, sem pressionar a amostra; D e E - dobras das duas extremidades em direção ao meio; F - elásticos colocados no saco fechado com as dobras.



❖ Fundos recifais, rodolitos e macroalgas

O monitoramento contempla amostragens trimestrais e semestrais em fundos recifais, bancos de rodolitos e fundos duros dominados por macroalgas nos pontos estabelecidos no TR, com as modificações acordadas durante o Primeiro Workshop da FEST/RRDM/CTBio (28/08/2018) (Quadro 15). Ajustes de localização dos pontos poderão ser feitos em função das incertezas em relação à presença de fundos recifais e bancos de rodolitos nas coordenadas do Quadro 15, que foram indicadas antes do início dos trabalhos.

Quadro 15. Malha amostral e tipos de amostragens do sub-projeto Fundos Recifais, Rodolitos e Macroalgas.

| | Lat | Long | Fotoquadrado | Coleta de macroalgas | Coleta de rodolitos | Coleta simbioses | PAM | Armadilha de sedimento | DropCam | CTD+multi parâmetro (abiótico) | CAUS | Toxicologia ** | Plâncton (flowcam) | Plâncton (citômetro) | | | | | |
|---------------------------|--------------|--------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|------|------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------|----------------|--------------------|----------------------|------|--------------|-----|------|------|
| Abrolhos "A" | -17.783076 | -39.051452 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | não | sim | não | veja fotoquadrado | sim | 3 estações + | não | 2 estações + ** | sim | | | | | |
| | -17.913657 | -39.145837 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | sim | sim | sim | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| | -17.9915 | -38.65094 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | sim | sim | sim | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| | -17.959684 | -38.701881 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | sim | sim | não | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| | -17.7722222 | -38.723 | sim (parcelas fixas) | não | sim** | N.A. | N.A. | sim | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| Esquecidos "B" | -18.87561119 | -39.43706051 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | sim | sim | sim | veja fotoquadrado | sim | 2 estações + | 1 ponto + ** | 2 estações + ** | sim | | | | | |
| | -18.64247562 | -39.49147811 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | não | não | sim | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| | -18.77461273 | -39.51785627 | sim (parcelas fixas) | não | N.A. | sim | sim | não | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| | -18.8981405 | -39.55295031 | sim (parcelas fixas) | não | sim** | N.A. | N.A. | sim | veja fotoquadrado | sim | | | | sim | | | | | |
| Foz "C" | -19.52209002 | -39.2123669 | veja dropcam | 3 estações + | 3 estações + ** | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | não | 1 ponto + ** | 2 estações + ** | sim | | | | | |
| | -19.54235422 | -39.17594125 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.56185968 | -39.1291523 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.73773921 | -39.53999585 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.75248621 | -39.52506997 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.76591706 | -39.51175988 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.77212166 | -39.68091969 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.81169269 | -39.6134119 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.82874457 | -39.59470387 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.93840542 | -40.0581613 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| APA-REVIS (embarcado) "D" | -19.93098539 | -39.92108304 | veja dropcam | 9 estações + | 9 estações + ** | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | 2 estações + | 1 ponto + ** | 2 estações + ** | sim | | | | | |
| | -19.92499417 | -39.80246096 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.98602288 | -39.75080655 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.04430893 | -39.77543985 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.00338457 | -39.83562628 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.02798339 | -39.9618725 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.00486314 | -40.08665173 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.08951463 | -40.12110615 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.11152123 | -39.99649893 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.1062085 | -39.88021948 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.15036192 | -39.80219382 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -20.17563164 | -39.83304653 | veja dropcam | | | N.A. | N.A. | N.A. | sim | sim | | | | sim | | | | | |
| | -19.90072592 | -40.09124821 | sim | | | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | | | | não | N.A. | 2 estações + | não | N.A. | N.A. |
| | -19.92087535 | -40.1014655 | sim | | | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | | | | não | N.A. | | | | N.A. |
| -19.9307925 | -40.11655341 | sim | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | não | N.A. | N.A. | | | | | | | | | |
| -19.97168429 | -40.13686216 | sim | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | não | N.A. | N.A. | | | | | | | | | |
| -20.00146433 | -40.14673937 | sim | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | não | N.A. | N.A. | | | | | | | | | |
| -20.03026713 | -40.15809524 | sim | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | não | N.A. | N.A. | | | | | | | | | |
| -20.03746886 | -40.1730815 | sim | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | não | N.A. | N.A. | | | | | | | | | |
| -20.07973076 | -40.17377818 | sim | sim | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. | não | N.A. | N.A. | | | | | | | | | |
| Setiba "E" | -20.58154734 | -40.36969621 | não | não | não | N.A. | N.A. | não | não | não | não | 1 ponto ** | não | não | | | | | |

+ localização exata das estações será definida após a primeira campanha
 ** semestral
 N.A. não se aplica (estrutura inexistente ou operacionalmente inviável)

- Modelo de rótulo para o subprojeto Fundos Recifais, Rodolitos e Macroalgas

Adicionalmente à rotulagem padrão de amostras da RRDM (Quadro 16), as amostras serão rotuladas com papel vegetal preenchido com caneta nanquim.

Quadro 16: Modelo de rótulo padrão para amostras.

| |
|-------------------------------|
| RRDM – Fundos Recifais |
| Estação: _____ |
| Coordenadas: _____ |
| Data: ____/____/____ |
| Hora: _____ |
| Profundidade: _____ |
| Tipo de amostragem: _____ |
| Coletor: _____ |
| Embarcação: _____ |
| Tipo de fundo: _____ |

Os rótulos serão inseridos no interior das embalagens de armazenamento. Identificações na parte externa das embalagens poderão ser utilizadas redundantemente, mas não dispensam os rótulos internos.

- Coleta de rodolitos

- Procedimento para coletas acima de 30 m de profundidade:

- Localizar ponto de coleta utilizando GPS e registrar a profundidade;

- Coletar manualmente e aleatoriamente, por meio de mergulho autônomo, pelo menos 30 rodolitos e transportá-los até a superfície com auxílio de sacos de coleta e lift bags.

Obs: Não havendo condições de mergulho será usado o procedimento para coletas abaixo de 30 m de profundidade.

- Procedimento para coletas abaixo de 30 m de profundidade:

- Localizar ponto de coleta utilizando GPS e registrar a profundidade;

- Lançar e recolher um ou mais tipos de amostradores dependendo das condições climáticas e tipo de fundo: A) busca fundo do tipo Van Veen ou B) draga de arrasto. Na draga de arrasto é importante que o comprimento do cabo seja maior que 2,5 vezes a profundidade do local.

- Procedimento imediato pós-coleta:

- Espalhar os rodolitos coletados em uma bandeja de triagem e fotografá-los junto a uma escala. Um rótulo de papel vegetal será disposto na bandeja e constará de pelo menos uma das fotos;

- Separar os rodolitos em morfótipos de algas calcárias incrustantes levando em consideração a forma de crescimento segundo Woelkerling et al. (1993), cor e tipos de estruturas reprodutivas, com auxílio de lupa portátil de 10x de aumento. Serão separados

pelo menos três rodolitos (quando houver) para cada morfótipo, os quais que serão destinados a estudos da taxonomia das algas calcárias incrustantes. Os demais rodolitos serão destinados às análises quali e quantitativas da comunidade bentônica associada. Rodolitos destinados a análises taxonômicas deverão ser fotografados individualmente em detalhe (macro), com escala, antes da fixação;

- Para taxonomia das algas calcárias, remover organismos epibiontes e incrustantes com auxílio de pinça e escovação. Secar as amostras à sombra com papel toalha, em local ventilado, por 48 h, embalar em papel filtro e armazenar em potes opacos ou sacos plásticos com sílica gel com indicador de umidade e em volume suficiente para cobrir a amostra e o rótulo. A sílica gel deverá ser substituída sempre que ficar úmida (alteração da cor de azul para rosa);
- Armazenar as amostras de rodolitos destinadas às análises quali e quantitativas em solução de formol 10% em água do mar, em potes opacos mantidos ao abrigo da luz direta e com rótulos de identificação.

OBS: O procedimento será realizado com uso de luvas, máscara e óculos de proteção.

Material:

- GPS e Ecosonda;
- Equipamento de mergulho autônomo, saco de coletas, lift bags;
- Busca fundo tipo Van Veen, draga de arrasto, cabos e guinchos;
- Bandejas de triagem, potes plásticos opacos, sacos plásticos;
- Equipamento fotográfico;
- Etiquetas de papel vegetal, caneta nanquim, papel de filtro, papel toalha;
- Régua, pinças, escovas;
- Sílica gel com indicador de umidade, formol 10%;
- Luvas de procedimento, máscara de proteção respiratória, óculos de proteção;
- Lupa portátil 10x.
- Amostragem de fundo com dropcamera
- Procedimento:
 - Localizar ponto de amostragem utilizando GPS e registrar a profundidade;
 - Lançar dropcamera com as câmeras ligadas (Figura 1);

- Após chegar ao fundo, aguardar pelo menos 2' para estabilizar o sedimento em suspensão;
- Fazer a tomada de imagem durante pelo menos 1';
- Fazer 5-8 lançamentos por ponto;
- Descarregar as imagens em notebooks e HDs externos.

Material:

- GPS, ecossonda;
- Dropcamera e acessórios, cabo, guincho;
- Notebook, HDs externos.

Descrição adicional:

A dropcamera consiste de uma estrutura metálica com filmadoras de alta resolução, RGB ou multispectral, e sistemas de iluminação (Figura 27), sendo lançada ao mar e recuperada por meio de um cabo acoplado a um guincho. Cada filmagem cobre uma área padronizada de onde são extraídos quadros estáticos compatíveis com fotoquadrados. Em cada ponto de coleta serão obtidos 5-8 registros. Os quadros estáticos serão utilizados para determinar a cobertura das formações recifais, densidade de rodolitos e macroalgas, vitalidade e a forma de rodolitos, e a identidade dos organismos no nível mais específico possível.

Figura 27. Exemplo de dropcameras.



- Amostragem de macroalgas no infralitoral (campanha não embarcada)

Procedimento:

- Localizar o ponto de coleta utilizando GPS;
- Identificar a zona do infralitoral;
- Demarcar um transecto de 10 m no infralitoral, marcando a posição com tubolite ou estacas de forma a orientar essa e a próxima amostragem;
- Ao longo do transecto, amostrar 10 quadrados aleatoriamente espaçados. Cada unidade amostral é composta por um mosaico de 15 imagens contíguas (Figura 28);
- Registrar fotograficamente cada quadrado, incluindo claquete com local, número do quadrado, data e outras informações pertinentes;
- Coletar macroalgas para análises qualitativas e produção de exsicatas para depósito em herbário;
- As macroalgas serão triadas e separadas no menor nível taxonômico possível. Cada talo será etiquetado, fotografado e dividido em uma parte destinada para morfoanatomia e outra para análises moleculares. Aquela destinada à morfoanatomia será preservada em formol 4% e acondicionada em potes escuros. A parte destinada à análises moleculares deverá estar livre de epibiontes e será seca à sombra, embrulhada em papel de filtro e armazenada em potes com sílica gel ou etanol 70%;
- As amostras de macroalgas que não forem triadas imediatamente após a coleta serão congeladas.

Material

- GPS;
- Quadrados, trena;
- Equipamento fotográfico;
- Espátula, marreta, talhadeira, massa epóxi, vergalhões;
- Caneta nanquim, etiquetas de papel vegetal;
- Formol 4%, Etanol 70%;
- Sílica gel, papel de filtro, bandejas para triagem, sacos e potes plásticos (diversos tamanhos).
- Descrição adicional:

Fazer o registro fotográfico de cada quadrado utilizando câmera fotográfica digital em resolução máxima, nos formatos raw e jpg (>10 megapixels), usando luz natural ou flash. Manter a câmera o mais estável possível e fotografar com velocidade >125 para evitar imagens com baixa nitidez. O

registro será preferencialmente realizado por fotógrafo experiente, de modo a garantir imagens de alta qualidade para análises qualitativas e quantitativas.

Figura 28. Fotografias submarinas do quadrado utilizado para a amostragem quantitativa de macroalgas bentônicas. A, quadrado inteiro com suas 15 subunidades; B, detalhe de uma das 15 subunidades.



- Instalação das Unidades de Calcificação (CAUs) e dataloggers

Procedimento:

- Localizar ponto de instalação utilizando GPS;
- Acesso ao fundo por mergulhadores;
- Em sedimento inconsolidado, fixar vergalhão de cerca de 1m de comprimento, com marreta. Em fundo recifal, fixar haste da CAU com marreta e cimentar a base com massa epóxi;
- Fixação da CAU na haste com abraçadeira de aço inox e/ou de nylon, utilizando chaves fixas;
- Fixação do datalogger na haste ou vergalhão da CAU utilizando abraçadeiras. Ajustar a posição de modo que o sensor de luz fique orientado para cima;
- Fazer o registro do número de CAUs e sensores instalados em cada ponto.

Material:

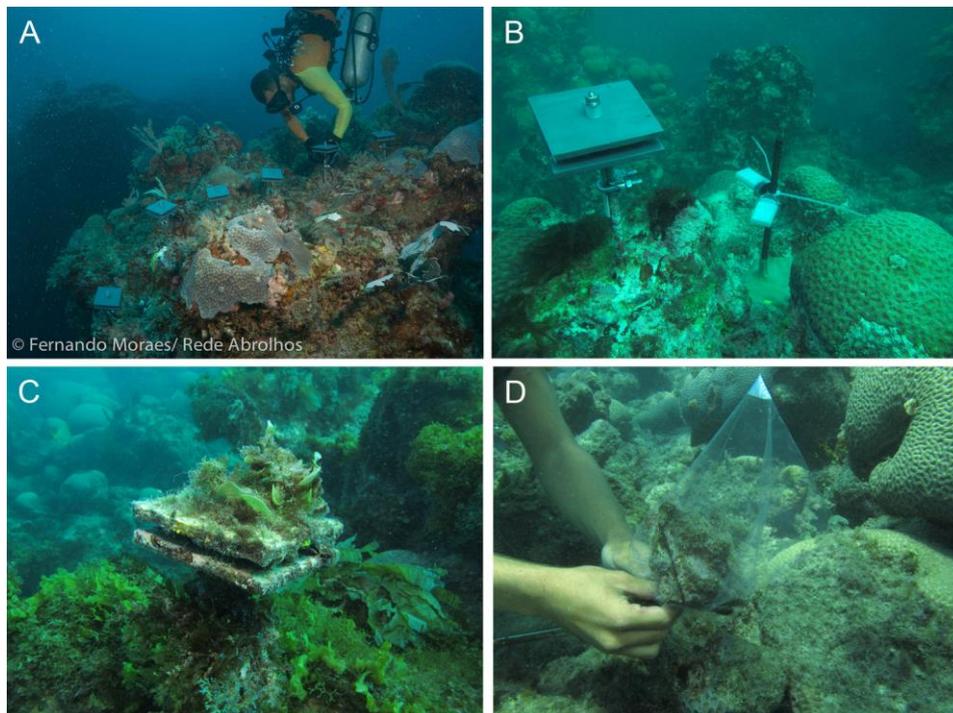
- GPS;
- CAUs;
- Chaves fixas, vergalhões, marretas, espátulas;
- Equipamento de mergulho autônomo;
- Dataloggers de temperatura e luminosidade;

- Massa epóxi, abraçadeiras de nylon e aço inox;
- Equipamento fotográfico.

Descrição adicional:

As unidades de calcificação (CAUs) serão instaladas em fundos recifais e bancos de rodólitos (Figura 29 A) segundo procedimento descrito em Reis et al. (2016). Em cada ponto serão instalados ao menos dois dataloggers para registro contínuo de temperatura e luminosidade (Figura 29B). A composição e a abundância dos organismos colonizadores das CAUs serão analisadas após 12 meses (Figura 29 C e D). Em campo, o mergulhador irá verificar a melhor área para a instalação dos vergalhões e prenderá a estaca com abraçadeiras. A barra rosqueada da CAU será presa na estaca com as presilhas, com auxílio de chaves fixas. O mergulhador irá se certificar que todas as CAUs estão bem presas, com menor risco possível de entortarem ou caírem, e sempre que necessário irá reforçar a fixação com massa epóxi.

Figura 29. Instalação e recuperação de estruturas de colonização (CAUs) e dataloggers em Abrolhos. A, instalação de CAUs; B, CAUs e dataloggers recém instalados; C, CAU colonizada após um ano de imersão; D, retirada de CAU envolta em saco plástico para preservar a integridade dos organismos e sedimentos.



- Retirada das CAUs e dataloggers

Procedimento:

- Localizar ponto de instalação com GPS;

- Acessar ponto com mergulhadores em posse do material de coleta e instalação;
- Inicialmente, as CAUs serão fotografadas ao lado das suas respectivas etiquetas de identificação (que estarão dentro dos respectivos sacos), servindo como claquete (Figura 30).
- Posteriormente, cada CAU será ensacada em saco plástico que, em seguida, será parcialmente fechado com abraçadeira de nylon. Esse procedimento será realizado com o cuidado de preservar o sedimento depositado e organismos associados à CAU (Figura 29D);
- Desparafusar a presilha que fixa cada CAU em suas estacas. Nesse momento, pequenas batidas nas porcas das presilhas com faca podem ser necessárias para liberar incrustações nas mesmas;
- Terminar de fechar o saco plástico com a abraçadeira de nylon e colocá-la no saco de coleta;
- Na embarcação, transferir a CAU com água do mar para uma bandeja, rinsar a CAU com água do mar para remoção do sedimento grosso. Filtrar a água da bandeja e armazenar o sedimento em pote plástico. Fotografar em detalhe cada face das placas fora da água, com suas respectivas etiquetas. Fixar cada placa da CAU em formol 4% e armazenar em sacos plásticos para posterior análises em laboratório. Quando presente, fazer a coleta do datalogger.

Material:

- GPS;
- Sacos plásticos resistentes, abraçadeiras de nylon, etiquetas de papel vegetal com identificação;
- Chaves fixas, faca, bandejas para triagem;
- Equipamentos de mergulho autônomo.

Figura 30. CAU após um ano de colonização, mostrando sua etiqueta inserida no saco antes da remoção.



- Coleta e processamento de sedimentos

Procedimento para pontos de coleta litorâneos (campanha não embarcada):

A coleta de sedimento será realizada manualmente com uma espátula dentada. Cada análise demandará uma forma de sub-amostragem diferente, conforme descrito abaixo.

- Metais e Mineralogia – Amostrar com espátula de plástico, raspando os 1-2 cm superficiais. As amostras deverão ter em torno de 25 g (~1/2 do volume do tubo) e serão armazenadas em Tubos Falcon de Falcon de 50 ml, identificadas, lacradas e congeladas assim que possível (congelador). Ao chegar no laboratório as amostras deverão ser liofilizadas e armazenadas em freezer;
- Granulometria - Amostrar com espátula de plástico, obtendo cerca de 200 g de amostra úmida. As amostras deverão ser armazenadas em sacos plásticos, fechados com elástico e refrigeradas (geladeira). No laboratório, as amostras serão secas em estufa e guardadas em potes de plástico com identificação.

Material:

- GPS;
- Tubos Falcon 50 ml, sacos plásticos 500 ml, etiquetas de papel vegetal;
- Parafilm, elástico;
- Espátula de plástico dentada;

➤ Geladeira/Freezer.

- Procedimento para coleta de sedimento de fundo (campanha embarcada)

A coleta de sedimento dos fundos de rodolitos será realizada com draga do tipo busca fundo Van Veen. O sedimento associado às amostras recuperadas pelas dragas será coletado com uma espátula e armazenado em Tubos Falcon de 50 ml, os quais serão acondicionados em freezer ou isopor com gelo.

Adicionalmente serão instaladas armadilhas de sedimento em seis pontos (Figura 31, Quadro 15). A ocorrência de lama alaranjada de menor densidade, na superfície da amostra, deverá ser anotada e, se possível, mensurada com uma régua. A instalação de armadilhas de sedimento seguirá os seguintes passos:

- Acoplar as armadilhas a vergalhões fixados nas estruturas recifais, de modo que a face aberta fique voltada para a coluna d'água e a face fechada para a estrutura recifal (Figura 31);
- A cada 3 meses os mergulhadores irão acessar as armadilhas, retirar a malha que protege a parte aberta da armadilha, recuperar a garrafa com os sedimentos aprisionados que se encontra dentro da armadilha, selá-la com tampa, colocar uma nova garrafa, recolocar o funil e a malha sobre a parte aberta da armadilha;
- A garrafa selada será trazida ao barco, identificada e resfriada em freezer, geladeira ou isopor com gelo.

Material:

- Pegador tipo Van Veen;
- Armadilhas de sedimento, vergalhão, marreta, abraçadeiras;
- GPS e ecossonda;
- Tubos Falcon 50 ml, sacos plásticos 500 ml, etiquetas de papel vegetal, parafilme, elásticos;
- Espátula de plástico dentada;
- Freezer, geladeira ou isopor com gelo, recipiente para nitrogênio líquido.

Figura 31. Preparo de armadilhas de sedimento (esquerda) e instalação em campo (direita).



- Coleta e processamento de amostras para toxicologia

Procedimento:

- Coletar uma espécie de macroalga, uma de esponja e duas de coral nas áreas amostrais (Quadro 15);
- Separar parte do material para análises de metais e parte para biomarcadores;
- Amostras para análise de metais serão preservadas em freezer, em sacos identificados, e as amostras para análise de biomarcadores serão preservadas em nitrogênio líquido, em tubos criogênicos identificados.

Material:

- Espátula, sacos plásticos, tubos criogênicos;
- Galão de nitrogênio líquido;
- Papel vegetal, caneta nanquim, bandejas para triagem.
- Procedimento de coleta e processamento de amostras de simbiontes de corais

Para a coleta de simbiontes de corais com a finalidade de quantificá-los e estudar sua diversidade morfológica e genética, será feita amostragem manual de espécimes de corais representativos de cada local de coleta, através de mergulho autônomo, seguida da raspagem de uma área conhecida do tecido do coral e preparação/acondicionamento de suspensões de células, seguindo os seguintes passos:

- Coletar fragmentos com ca. 15 cm² de espécimes de corais representativos do local, no mínimo 3 e no máximo 5 espécimes de cada espécie escolhida;
- Registrar imagem digital de cada espécime, usando escala de tamanho;

- Com o auxílio de uma pistola de ar comprimido, remover o tecido de cada espécime, transferindo para um tubo falcon de 50 mL com 30 mL de água do mar filtrada em 0,2 μm ;
- Registrar imagem de cada espécime após a remoção do tecido, usando escala de tamanho;
- Cobrir a superfície do espécime com papel alumínio, remover os excessos para que o papel alumínio cubra exatamente a área raspada, remover o papel alumínio e acondicionar em uma pasta plástica rotulada;
- Homogeneizar a suspensão de células invertendo vigorosamente o tubo diversas vezes;
- Com um pipetador automático, transferir 3 alíquotas de 2mL da suspensão para criotubos rotulados de 2mL. Acondicionar os tubos em nitrogênio líquido;
- Transferir 12 mL da suspensão para tubo falcon de 15 mL rotulado, adicionar 3 mL de solução de paraformaldeído à 10% e acondicionar sob refrigeração (geladeira ou isopor com gelo);
- Transferir 9 mL da suspensão para tubo falcon de 15 mL rotulado, adicionar 1 mL de solução de formaldeído à 20% e acondicionar sob refrigeração (geladeira ou isopor com gelo);
- Transportar as amostras até o laboratório nas mesmas condições de armazenagem em campo;
- Amostragem de comunidades planctônicas associadas aos fundos recifais.

A coleta de amostras do plâncton associado aos sistemas recifais será feita com garrafa tipo Niskin e redes de plâncton de diversas aberturas de malha, nos locais indicados no Quadro 15:

Coletas com garrafa:

- Coletar 5L de água próximo das estruturas recifais (fundo) e na superfície (0,5 m) com garrafa de Niskin;
- Transferir uma alíquota de 1.800 mL para uma proveta, aferir o volume e transferir o conteúdo para um frasco de 2L opaco (preto) com 200 mL de solução de formaldeído à 20% tamponado com hexametilenotetramina, armazenar à temperatura ambiente e protegido da luz solar direta;
- Transferir uma alíquota de ca. 50 mL para um tubo falcon de 50 mL limpo;
- Com o auxílio de um pipetador automático, transferir do tubo falcon 3 alíquotas de 1,5 mL para criotubos de 2 mL rotulados;
- Adicionar 34 μL de solução de glutaraldeído à 25% à cada criotubo, homogeneizar invertendo o tubo diversas vezes, e acondicionar no escuro por 15 minutos;
- Passados os 15 minutos, acondicionar os criotubos diretamente em nitrogênio líquido;

- Filtrar sob vácuo (<10 mmHg) entre 500 e 1000 mL da amostra da garrafa Niskin (ou no máximo por 15 minutos, o que acontecer primeiro) em filtro de fibra de vidro (GF/F 25 mm de diâmetro); o volume filtrado depende da quantidade de material particulado presente na amostra; finalizar a filtração ao colmatar o filtro. **IMPORTANTE:** anotar o volume filtrado em planilha apropriada;
- Com o auxílio de pinça, dobrar os filtros com o lado contendo a amostra para dentro, transferir para um criotubo de 2 mL rotulado e acondicionar em nitrogênio líquido;
- Transportar as amostras até o laboratório nas mesmas condições de armazenagem do campo (N líquido).

Coletas com redes de plâncton:

- Realizar entre 5 e 10 arrastos verticais desde próximo ao fundo até a superfície com a rede de malha de 60 μm (abertura de 30 cm de diâmetro);
- Transferir, cumulativamente, o material de cada arrasto para um Becker plástico;
- Em uma proveta, aferir o volume a 180 mL com água do mar filtrada em 0,2 μm ;
- Transferir para frasco âmbar de 250 mL contendo 20 mL de formaldeído à 20% tamponado com hexametilenotetramina, acondicionar a temperatura ambiente abrigado da luz solar direta;
- Realizar arrasto horizontal na superfície por 10 minutos com rede de plâncton com malha de 500 μm (abertura de 40 cm de diâmetro) com fluxômetro acoplado à boca. **IMPORTANTE:** anotar em planilha apropriada o valor lido no fluxômetro antes e ao final de cada arrasto;
- Transferir o material para uma proveta, aferir o volume a 400 mL com água do mar filtrada em 0,2 μm ;
- Transferir para um frasco de 500 mL contendo 100 mL de formaldeído à 20% tamponado com hexametilenotetramina, acondicionar a temperatura ambiente abrigado da luz solar direta;
- Transportar as amostras até o laboratório nas mesmas condições de armazenagem do campo (temperatura ambiente e protegido da incidência de luz solar direta).

Materiais para os procedimentos de coleta com rede de plâncton e coleta com garrafa:

- Redes de Plâncton (Figura 32) com malhas de 60 e 500 μm m, diâmetro de boca de 30 e 40 cm, com fluxômetro;
- Garrafa Niskin 5 L (Figura 32);
- Frascos plásticos âmbar 500 mL, frascos de plástico âmbar 2 L, criotubos 2 mL, tubos Falcon 15 e 50 mL;
- Galão de Nitrogênio Líquido, isopor com gelo;

- Soluções de formaldeído 20% (tamponado com hexametenotetramina), paraformaldeído 10%, glutaraldeído 25%;
- Bomba de vácuo elétrica, filtros de fibra de vidro Whatman GF/F 25 mm (Figura 33);
- Equipamento fotográfico;
- Espátulas metálicas e plásticas, pistolas de ar e cilindro de ar comprimido com regulador (Figura 34);
- Caneta marcadora permanente e bandejas plásticas, beckers e provetas plásticas de volumes diversos, papel alumínio, sacos plásticos de diversos tamanhos.

Figura 32. Rede de Plâncton e Garrafa Niskin para coleta do plâncton.



Figura 33. Bomba a vácuo e filtros para análise de clorofila.



Figura 34. Pistola de ar e amostra de coral para raspagem de tecido.



- Amostragem quali e quantitativa em comunidades recifais bentônicas (fotoquadrados)

Procedimento:

- Localizar o ponto de coleta com GPS (Quadro 15), buscar os vergalhões previamente instalados e marcar o ponto com uma bóia pequena presa ao substrato, a qual deve ser removida após o imageamento;
- Na primeira visita, delimitar 10 parcelas fixas distanciadas aleatoriamente ao longo de um trecho de 20-50 m. Fixar dois vergalhões para cada unidade amostral, em ângulos opostos do quadrado de PVC (Figura 28). Nas formações recifais em forma de pináculos serão estabelecidas 10 parcelas fixas no topo e 10 parcelas na parede vertical de cada pináculo (ou conjunto de pináculos adjacentes);
- Em cada parcela, posicionar o quadrado sobre o recife, de modo que seus ângulos opostos estejam em contato com os dois vergalhões. Fazer o registro fotográfico do quadrado e de cada uma de suas 15 subunidades (Figura 28). Cada quadrado será previamente fotografado junto com uma claquete com informações sobre o ponto de amostragem, habitat (topo ou parede) e data;
- Coletar, fora da área do quadrado, táxons de organismos bentônicos representativos da área amostrada para análises taxonômicas e depósito de material testemunho em coleções científicas.

Na embarcação, os organismos bentônicos serão triados e separados no nível taxonômico mais específico possível. Este material será fotografado, etiquetado e preservado em etanol 70 ou 96%.

Material

- GPS;

- Quadrados, trena, vergalhões;
- Equipamento de fotografia submarina, pranchetas acrílicas;
- Espátula, marreta, talhadeira;
- Caneta nanquim, etiquetas de papel vegetal;
- Etanol 96% e 70%;
- Sacos e potes plásticos (diversos tamanhos), bandejas para triagem.

Descrição adicional:

Fazer o registro de cada quadrado com câmera digital em resolução máxima e nos formatos de arquivo raw+jpg (>10 megapixels, resolução >300 dpi), com luz natural ou flash. Manter a câmera o mais estável possível e fotografar com velocidade ≥ 125 para evitar imagens com baixa nitidez. O registro fotográfico será preferencialmente realizado por fotógrafo profissional ou experiente, de modo a garantir imagens de alta qualidade que permitam análises qualitativas e quantitativas dos organismos.

- A avaliação da condição fisiológica dos corais com fluorímetro (Diving-Pam)

Serão avaliados corais provenientes de recifes submetidos a diferentes regimes oceanográficos (próximos e afastados da costa, Quadro 15), em diferentes profundidades e condições (branqueados, doentes e saudáveis). As medições devem ser realizadas por pesquisador ou técnico capacitado a operar o Diving-PAM, seguindo os seguintes passos:

- Carregar a bateria do Diving-PAM antes de ir a campo (Bateria cheia -> entre 12,5 e 12,9V);
- Conectar o cabo de fibra óptica e sensor de luz;
- Verificar a integridade da caixa estanque do equipamento antes do mergulho;
- Ligar o equipamento (ON, ao lado do conector da fibra óptica) e verificar se está no MENU 1;
- Posicionar a extremidade livre da fibra óptica entre 5-20 mm do organismo a ser analisado;
- Apertar o botão START para a emissão do pulso de luz e aquisição dos dados;
- Esperar a luz se apagar antes de proceder para a próxima medida;
- Fotografar o organismo analisado in situ (com identificação em prancheta).

OBS1: Instalar o software PAMTRANS.EXE no notebook para exportar os dados.

OBS2: Para medidas do rendimento efetivo do fotossistema II in situ com luz ambiente (sem aclimatação no escuro), o rendimento é determinado por: $(F'm - F)/F'm$, onde $F'm$ é o rendimento

de fluorescência máxima em organismo adaptado a luz após o pulso de luz saturante e F é a fluorescência normal sob luz ambiente.

Material

- Equipamento de mergulho autônomo;
- Diving-PAM e notebook com softwares instalados;
- Pranchetas e lápis para anotação submersa;
- Equipamento de fotografia submarina;
- Etiquetas de papel vegetal, pranchetas acrílicas.
- Aquisição de dados ambientais in situ

Em cada estação de monitoramento será realizada perfilagem da coluna d'água com CTD e ADCP, aos quais será acoplado instrumental multiparâmetro (Plataforma Seaguard). Além das perfilagens, serão feitas medidas contínuas próximo aos recifes e bancos de rodolitos, cobrindo pelo menos um ciclo completo de marés em localidades representativas de cada setor da área de estudo. Além de CTD e ADCP, a plataforma será munida de sensores de turbidez, fluorescência, pH, CO₂ e oxigênio dissolvido. Após cada perfilagem ou bloco de medição contínua os dados serão descarregados em computador portátil e resguardados em HDs externos, em pastas específicas para cada estação de amostragem.

OBS: Esses dados serão adquiridos apenas após a conclusão do processo de importação dos instrumentos.

Material

- CTD, ADCP, Plataforma Seaguard, computador notebook;
- Gerador portátil, cabos elétricos, estabilizadores;
- Cabos, guinchos, bóias e poitas para fundeio;
- Equipamento de fotografia;
- Etiquetas de papel vegetal, pranchetas acrílicas.

5.3.5 Matriz leito marinho

- ❖ Sistema de batimetria multifeixe
- Principais componentes

O Sistema Multibeam R2 Sonic 2024 consiste em uma interface de sonar cujos principais componentes são apresentados na (Figura 35).

Figura 35. Principais componentes do Sistema Multibeam R2 Sonic 2024: 1) Sonar head (Sonic 2024); 2) Modulo de interface sonar (SIM – Sonar Interface Module); 3) POS MV WAVEMASTER II (Georeferenciamento, compensador de movimento); 4) Perfilador de velocidade do som (MiniSVP Sound Velocity Profiler); 5) Sensor de velocidade do som (MiniSVS Sound Velocity Sensors); 6) Software de batimetria o Hypack Max & Hysweep e QPS (QINSy Offshore Bundle); 7) Diversos cabos (Sonar Head, cabos auxiliares, energia, dentre outros); 8) Equipamentos de Informática (monitores, teclado, mouse, filtros de linha, adaptadores, etc).



- Operação e Aquisição de dados

O Plano de Levantamento Hidrográfico (PLH) deve ser elaborado anteriormente ao processo de mobilização de modo que as linhas de sondagem estejam dispostas paralelas as linhas isobatimétricas da área e atinja uma cobertura de 100% com um recobrimento de 30%.

O sistema Multibeam, modelo R2 Sonic 2024, consiste no equipamento que, certamente, demanda uma maior precisão no processo de mobilização. Este sistema é capaz de atingir uma leitura precisa do fundo marinho desde que sejam corretamente instalados, calibrados e formados por sensores de alta precisão. Com o objetivo de diminuir as incertezas do levantamento batimétrico, o sistema Multibeam deve ser instalado e alinhado com a embarcação, preferencialmente, docada, a fim de alinhar corretamente seus equipamentos e realizar a medição dos offsets entre os sensores componentes do sistema (antenas GPS, sensor de movimento, transdutores, antenas dos posicionadores) e estabelecer um ponto de referência na embarcação para medição da profundidade do transdutor (waterline) durante a aquisição do dado.

Além destes, os dados referentes às oscilações da maré no instante do levantamento deverão ser adquiridos por meio de Acoustic Doppler current profiler (ADCP) instalado sobre o leito marinho próximo as áreas levantadas. As leituras deverão ser realizadas em intervalos não superiores a 10 minutos. O registro de maré deve-se iniciar um dia antes do início da sondagem até um dia após o seu término, sendo que todos os procedimentos de aquisição e processamento dos dados serão realizados conforme as Normas da Autoridade Marítima para Levantamentos Hidrográficos (NORMAM 25), revisão 02, de julho de 2017. As observações maregráficas serão reduzidas por meio de um zoneamento de maré entre duas referências verticais de nível (datum).

Posteriormente a instalação dos equipamentos, deverá ser realizado o patch test, visando a calibração do sistema Multibeam. Este procedimento compreende a comparação dos dados batimétricos entre áreas de sobreposição de dados. Sendo que os parâmetros utilizados na calibração são os ângulos roll, pitch e yaw. O patch test deverá ser realizado em uma região próxima ao levantamento e toda vez que houver alteração na posição de algum sensor do sistema e no início de cada levantamento. Os arquivos das linhas de sondagem executadas durante o Patch test devem ser claramente identificados, conforme exemplo:

Ex: Pitch_(numeração do laboratório)_(data)_(hora)

Obs: As numerações das linhas devem obedecer a numeração prévia estabelecida pelo laboratório.

O Roll deve ser realizado em uma região mais plana possível sempre em linha reta. Sendo uma linha indo e outra voltado na mesma velocidade. Para o pitch a região precisa apresentar uma inclinação sendo uma linha indo outra voltando com a mesma velocidade.

Já para Yaw a região também deve apresentar uma inclinação sendo duas linhas em paralelos na mesma direção. É importante ao longo do levantamento monitorar em tempo real os valores do pitch e roll a fim de verificar se estão dentro dos limites de confiabilidade do equipamento.

A realização da perfilagem da coluna d'água do local, com o Perfilador de Velocidade do Som (SVP), faz-se necessário, a fim de corrigir qualquer interferência do fenômeno de refração do som (que ocorre devido à presença de camadas de água com propriedades físicas cuja diferença seja significativa) na determinação da profundidade pelo sistema multibeam, assim deve-se adquirir perfis de velocidade do som durante o levantamento toda vez que for observada perda na qualidade dos dados por problema de refração dos feixes externos. O Sistema de multifeixe deve dispor de um sensor de velocidade do som instalado próximo do transdutor, para medição contínua da velocidade do som, permitindo assim, o correto direcionamento dos feixes quando forem transmitidos. É fundamental durante todo o levantamento realizar o controle e monitoramento dos dados obtidos, a fim de garantir a qualidade dos dados obtidos.

Obs: Estas informações devem estar devidamente registradas no fieldbook.

- Medições diárias sobre o draft/waterline da embarcação serão necessárias. Uma vez que, ao longo do dia o calado da embarcação sofre alterações devido o consumo de combustível e insumos. Essas informações devem estar devidamente registradas no fieldbook;
 - A medida do ângulo (angle) do feixe deve ser mantida constante (90°), juntamente com o valor do ganho (power gain) e comprimento de pulso (pulse length) de maneira a assegurar uma melhor qualidade dos dados de backscatter;
 - Realizar testes para medição do squat do navio, onde serão definidos os valores de variação vertical da embarcação em função das diferentes velocidades usadas para a sondagem;
 - Executar linhas de verificação (LV) dispostas de modo, aproximadamente, perpendicular às linhas regulares de sondagem, para possibilitar a detecção de erros grosseiros ou sistemáticos.
- Organização dos arquivos a serem coletados

Os arquivos adquiridos durante a coleta deveram ser organizados nos HD's de campo nos formatos .s7k, .RAW, .HSX. Os dados devem obedecer a numeração previa proposta pelo laboratório.

Os arquivos devem conter as seguintes informações:

- Se for uma linha de PT deve ser descrita qual linha pertence;

Ex: Pitch_(numeração do laboratório)_(data)_(hora)

- Caso seja as linhas do levantamento.

Ex: Área_ou_linha_(numeração do laboratório)_(data)_(hora).

- Organização das pastas

As pastas devem ser organizadas por equipamento de aquisição, separados por dia de levantamento.

Ex: MDES – (data) – (arquivos) -

- Organização do Fieldbook

Um arquivo de Fieldbook deve ser criado para cada dia de levantamento realizado, contendo as informações relevantes ocorridas durante a aquisição dos dados (medições de draft/waterline, momentos de aquisição de SVP, possíveis problemas durante o levantamento, entre outros):

Ex.: LINE NAME; TIME; AZIMUTE; POWER GAIN; PULSE LENGHT; MAX RATE; ABSORTION; SPREADING; END TIME; END FILE; ANGLE.

- Cuidado e observações: ou recomendações e segurança

O Sonar head terá sua disposição localizado na parte inferior da embarcação, por isso torna-se necessário um cuidado redobrado da navegação em áreas rasas, pois há risco de colisão com estruturas de fundo.

Uma limpeza do Sonar head constantemente também se faz necessário, devido a possíveis problemas de incrustações. O que pode ocasionar uma falha no sistema ou até mesmo danificar o equipamento.

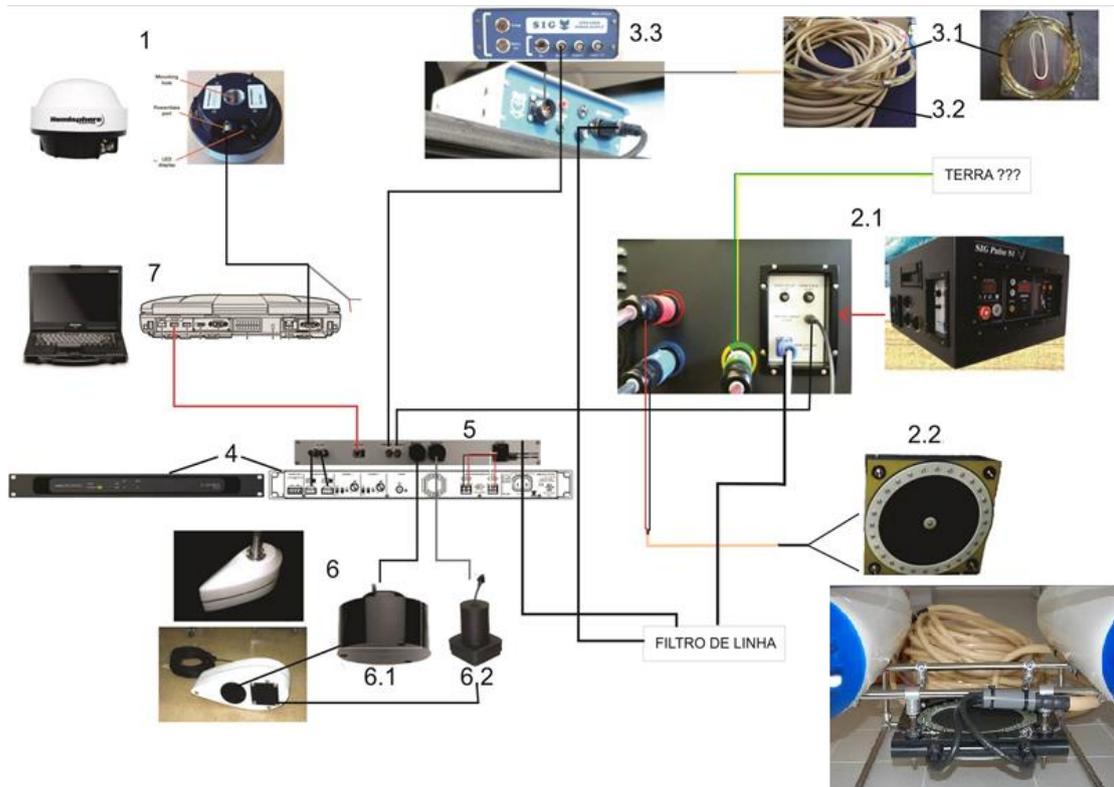
❖ Sistema sísmico de alta resolução

O Sistema Sísmico de Alta Resolução (SSAR) que será utilizado no projeto RENOVA consiste em um sistema desenvolvido pela Meridata Finland Ltd que opera simultaneamente três equipamentos sísmicos: Chirp (alta e baixa frequência) e Boomer. Este sistema (MD DSS MULTI-MODE SONAR SYSTEM) faz a aquisição dos dados através do software MDCS (Marine Data Collection Software), sendo este protegido por um sistema de proteção. A chave de proteção (dongle) deve estar conectada na porta USB do computador e drivers necessários são instalados como parte do processo de instalação.

Neste protocolo estão descritos os principais componentes do sistema MD DSS, assim como, as principais informações da operação de aquisição sísmica deste sistema. A montagem do MD DSS e configuração do software de aquisição (MDCS) estão descritos em manuais específicos (Manual de montagem e Manual de configuração – Sistema Meridata) do Laboratório de Oceanografia Geológica (LabOGeo) da UFES.

Os principais componentes do sistema MD DSS estão listados e descritos abaixo e identificados na (Figura 36).

Figura 36. 1. Antena GPS (A101); 2. Sistema SIG Pulse; 2.1. Fonte de energia SIG Pulse S1; 2.2. Fonte de som (Boomer); 3. SIG Streamer; 3.1. Seção ativa; 3.2. Cabo reboque; 3.3. Caixa de alimentação; 4. Amplificador de transmissão do Chirp; 5. Unidade de interface UASP3C; 6. Transdutor do Chirp; 6.1. Alta frequência (HF - High frequency); 6.2. Baixa frequência (LF - Low frequency); 7. Computador.



Em que:

- Antena GPS (A101) é uma antena GPS com rápida inicialização que permite uma precisão de centímetros. Todas as ligações e portas estão localizadas na parte inferior da unidade, assim como o indicador LED de funcionamento;
- 2. O Sistema SIG Pulse é uma associação de um carregador de capacitores de alta tensão e de uma interface de alta tensão denominada “Thyristor” (componente semi-condutor, muito estável e constante, sem perda de energia e sem sobreaquecimento). Os capacitores armazenam energia e são, em paralelo, conectados e acoplados a cabos transmissores de alta tensão, de acordo com a energia requerida;
- 2.1. Fonte de energia SIG Pulse S1 – Conexões: Cabo HV vermelho e azul, “Cabo terra” amarelo/verde, Cabo branco Trigger (BNC);
- 2.2. Fonte de som – Boomer: A placa de energia do Boomer (modelo de pulso Maxi-300) é uma fonte de energia relativamente pequena e leve. NÃO se deve exceder os valores limites especificados para esta placa, pois um único impulso errado pode resultar em danos imediatos;

- 3. SIG Streamer: é o conjunto de instrumentos básicos para a recepção do sinal sísmico. Os hidrofones são montados no interior de um tubo de poliuretano, que é chamado de “Seção Ativa” (3.1);
 - 3.1. Seção ativa – Esta seção tem uma densidade um pouco maior do que 1, para mantê-lo abaixo da superfície do mar;
 - 3.2. Cabo reboque – tubo de PVC que também auxilia na flutuabilidade;
 - 3.3. Caixa de alimentação – fonte de energia que permite a conexão dos hidrofones com qualquer amplificador ou sistema de gravação, que geralmente tem entradas BNC. Ele contém uma bateria de 12V e uma saída para cada grupo de hidrofones;
 - 4. Amplificador de transmissão do Chirp – amplificador de transmissão do sinal sísmico;
 - 5. Unidade de interface UASP3C – unidade de interface entre os sistemas sísmicos e a visualização dos dados.
- Operação e Aquisição de dados

A operação do sistema MD DSS deverá ser realizada ou supervisionada por profissionais qualificados que tenham experiência com o sistema e/ou realizado o treinamento de montagem e configuração de softwares oferecido pela Meridata. É importante a leitura de TODO o protocolo antes de iniciar a operação de aquisição.

A partir do sistema montado na embarcação, assim como, os softwares de aquisição instalados e configurados, a operação deverá seguir os passos abaixo:

- 1. Certifique-se de que todos os cabos estão conectados corretamente e protegidos;
- 2. Verifique se os transdutores do chirp estão submersos na água;
- 3. Ligue o gerador (fonte de alimentação de 230 V AC) e conecte o filtro de linha desligado nele;
- 4. Ligue a Unidade de interface UASP3C e o GPS ao filtro de linha;
- 5. Ligue o computador e entre no Windows;
- 6. Inicie o MDCS □ abra ou crie um projeto de acordo com as instruções do Manual de configuração MDCS;
- 7. O subsistema chirp profiling inicia-se automaticamente;
- 8. Para iniciar o subsistema boomer:
 - 8.1. Ligue a Caixa de alimentação do Streamer – Não ligar a fonte de alimentação deste durante a operação (ver recomendações);

- 8.2. Faça o teste de toque no streamer;
 - 8.3. Coloque o streamer na água enquanto a embarcação está se movendo □ liberar a quantidade de cabo necessária sempre com o barco em movimento;
 - 8.4. Verifique se todos os cabos da Fonte de energia Pulse S1 estão conectados corretamente;
 - 8.5. Coloque o cabo terra do Pulse S1 na água (o ideal são dois metros de cabo submersos);
 - 8.6. Coloque a fonte de som sísmica (catamarã boomer) na água □ Lançar o catamarã com cautela. O cabo deve ser lançado gradualmente aumentando-se a velocidade do barco até a velocidade máxima (4 a 5 nós). Após o estabelecimento das condições adequadas de reboque, a fonte acústica deve ser mantida pelo menos a 10 cm abaixo da água que será controlado pela velocidade do barco;
 - 8.7. Conecte a Fonte de energia Pulse S1 ao filtro de linha;
 - 8.8. Solte o botão SURGE no Pulse S1 (girando o botão);
 - 8.9. Ligue o Pulse S1 usando a chave;
 - 8.10. Verifique se a luz do TRIGGER no Pulse S1 está piscando e que a luz HV OFF está ligada;
 - 8.11. Selecione um nível de energia com os botões de seleção de nível de energia e, em seguida, pressione o botão VALID para confirmar (o botão vermelho HV ON começará a piscar);
 - 8.12. Para cancelar o nível de energia após a validação acionar o botão Cancel e selecionar o novo nível de energia e valide novamente;
 - 8.13. Pressione o botão vermelho HV ON piscando para iniciar a alta tensão (HV ON irá mostrar uma luz vermelha, enquanto HV OFF será apagado);
 - 8.14. Agora, a Fonte de energia Pulse S1 está em operação enviando alta tensão. Deve-se iniciar esta operação com baixas energias, e aumentar progressivamente.
 - 8.15. Para parar a emissão de energia do Pulse S1, SEMPRE pressione o HV OFF (botão amarelo) primeiramente e assim o HV ON (botão vermelho) irá apagar. Para alterar a energia, repita o procedimento a partir do item 8.11;
 - 8.16. Verificar os resultados no MDCS;
 - 9. Inicie a gravação dos dados no MDCS.
- Cuidado e observações: ou recomendações e segurança

Durante a operação, é importante observar o funcionamento de alguns itens:

- Distância ideal entre streamer e catamarã;
 - O “cabo terra” deve ficar emerso na água durante toda a operação;
 - Existe um micro-interruptor de segurança no conector do eletrodo que não autoriza qualquer alta voltagem dentro da fonte de energia se o cabo do eletrodo não está conectado;
 - Este cabo de saída, a partir da fonte de energia para a fonte de som, carrega uma alta tensão, e deve ser lembrado para nunca ficar sobre ele!;
 - NÃO ligar o sistema sem conectar todas as conexões e equipamentos na água;
 - Somente técnicos qualificados devem proceder à instalação e operação do sistema;
 - Os operadores devem ser informados sobre o perigo e treinados para o uso de alta tensão;
 - É também da responsabilidade do operador informar à equipe do perigo do equipamento;
 - É importante colocar o cabo terra na água antes de ligar o sistema;
 - O gerador também deve ser corretamente aterrado;
 - A placa deve ser operada sempre completamente imersa. Antes de lança-la ao mar deve-se observar se todas as conexões e estrutura do catamarã estão corretas;
 - Não deve-se torcer a placa e deve-se ter cuidado ao lançar e recuperar a placa para evitar qualquer dano na tampa de borracha;
 - A unidade nunca deve ser operada com o diafragma danificado. A entrada de água pode causar danos irreparáveis;
 - Não pisar na seção ativa, pois os hidrofones são extremamente frágeis;
 - Após o uso, guarde-os de volta em sua caixa;
 - Não dobrar o tubo de poliuretano.
- ❖ Vídeomonitoramento dos habitats
- Principais componentes

Para a realização desta etapa será utilizado o sistema de dropcam eo sistema de towed camera. O sistema dropcam é composto por câmeras de alta resolução acoplados em uma estrutura metálica associado a um conjunto de baterias e lanternas de leds de diferentes intensidades (Figura 37). Este sistema apresenta uma área de levantamento pré-definida de 60x60 cm.

Figura 37. Sistema de dropcamera



Através da utilização da towed camera é possível obter uma visualização do ambiente subaquático e realizar gravações e arquivamento de vídeos em tempo real.

- Operação e Aquisição de dados
 - Operação com a Towed Camera (TC)

O monitoramento dos transectos com a TC será realizado através da navegação submersa deste equipamento em áreas pré-determinadas. É importante ressaltar que as condições oceanográficas como turbidez da água e força das correntes de fundo são variáveis ao longo da plataforma e podem prejudicar a navegação submersa planejada. Os transectos permitirão um imageamento a uma distância do fundo que irá caracterizar a paisagem do habitat principal ao longo da mudança de profundidade.

Para o imageamento, a TC deverá ser ligada ao chegar no ponto inicial de amostragem e verificado o seu funcionamento. O equipamento deverá ser lançado e ao atingir o fundo marinho, um tempo de 2 minutos deverá ser dedicado para estabilização do sistema submerso. Após este tempo, a navegação no transecto selecionado poderá ser iniciada e funções do próprio equipamento poderá auxiliar na navegação.

- Operação com as estruturas de Dropcam

Ao chegar nas estações de amostragens, verificar se a câmera e as lanternas estão funcionando adequadamente. Antes do lançamento do equipamento na água, é imprescindível a filmagem de uma placa com informações do ponto de amostragem (como nome, local e profundidade) objetivando a organização das imagens dentro do arquivo interno da dropcam.

A operação consiste no lançamento desta estrutura, com auxílio de guincho, em coordenadas pré-determinadas ao longo de cada transecto. Ao verificar que a estrutura chegou ao fundo, inicia-se a contagem de 2 minutos e, posteriormente, inicia-se o procedimento de subida da estrutura. Este tempo faz-se necessário, uma vez que qualquer perturbação no fundo pode ocasionar a ressuspensão de algum material, dificultando a visualização do fundo.

Após a subida da estrutura realizar o processo de desligamento de câmera e lanternas, para evitar o gasto excessivo de baterias ao longo dos pontos. A operação de imageamento do fundo marinho vai seguir o seguinte procedimento:

Transectos de no mínimo 2km de distância, espaçados de 5km serão realizados cobrindo as áreas mapeadas com diferentes padrões de backscatter;

Ao longo dos transectos, pelo menos 3 áreas serão definidas no primeiro levantamento de campo para o lançamento da dropcamera. A drop câmera será lançada em uma área pré-definida de 20x20m, onde 5 descidas e subidas serão realizadas dentro desta área.

Esse procedimento será repetido trimestralmente.

Cuidado e observações: ou recomendações e segurança

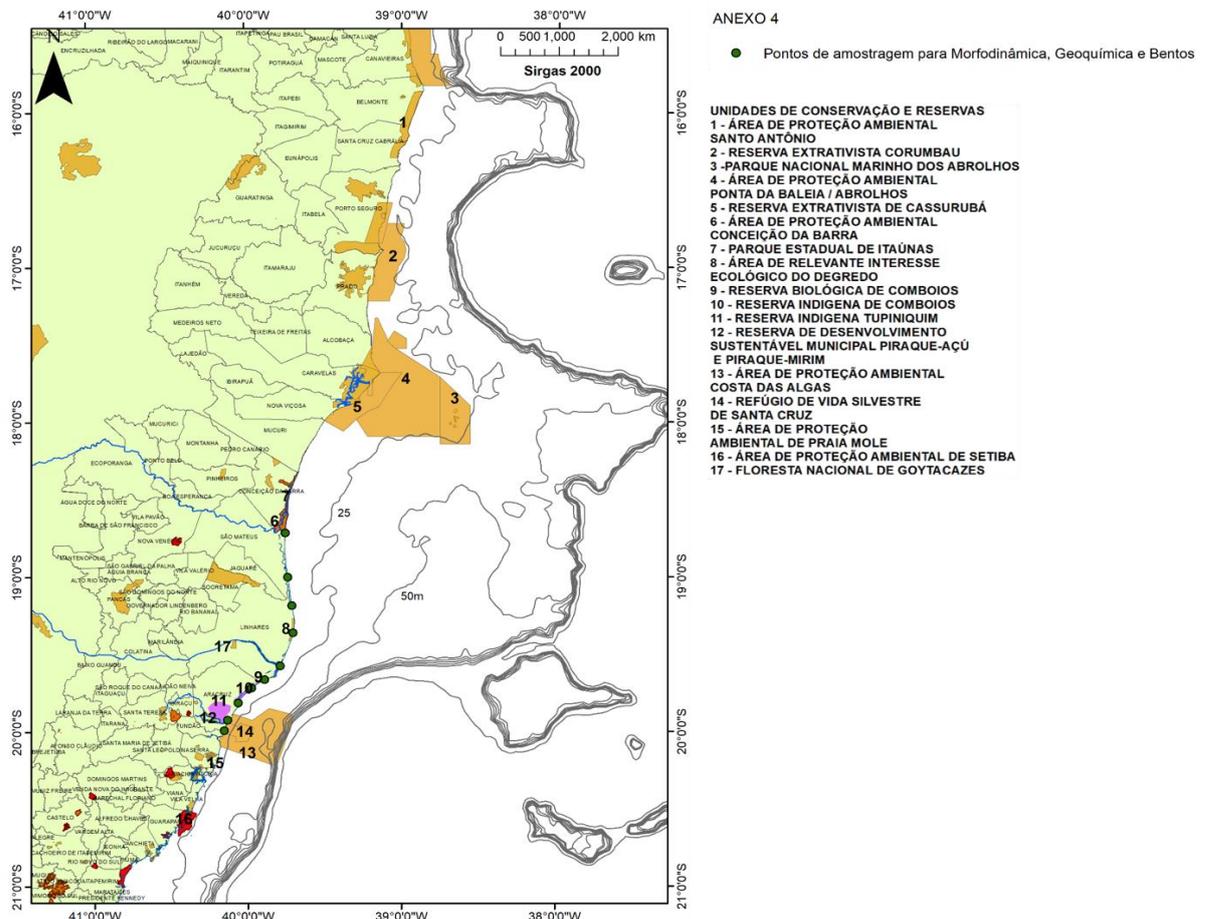
- - Faz-se necessário deixar o barco ligado durante a operação a fim de manter e/ou minimizar possíveis derivações/deslocamentos do ponto;
- Observar sempre a direção do cabo e/ou corda do equipamento que estão submersos a fim de evitar que os mesmos entrem em contato com o motor do barco;
- Descer a estrutura ou equipamento lentamente para evitar que estes cheguem ao fundo de maneira brusca, evitando que sejam danificados;
- Verificar constantemente as câmeras a fim de verificar suas integridades e funcionamento;
- No final de cada dia do levantamento as câmeras e lanternas devem ser lavadas com água doce e devidamente secas;
- Verificar diariamente as baterias e recarrega-las.

5.4 ANEXO 4. MONITORAMENTO AMBIENTAL NA PRAIA E ANTEPRAIA ADJACENTES À FOZ DO RIO DOCE

O monitoramento do sistema praiial adjacente à desembocadura do rio Doce é realizado em 10 estações amostrais distribuídas ao longo do litoral norte do Espírito Santo. O monitoramento é realizado a partir do levantamento topobatimétrico de perfis praiiais transversais à linha de costa e da coleta de sedimento para análises sedimentológicas, geoquímicas e biológicas (Figura 38 e Quadro 17).

O programa tem duração de 12 meses. Neste período, devem ser realizadas 4 campanhas trimestrais para análises morfodinâmicas e geoquímicas e 2 campanhas semestrais para análise da comunidade bentônica. A partir do levantamento topobatimétrico dos perfis praiiais e da coleta de sedimento devem ser analisados os parâmetros apresentados no Quadro 18.

Figura 38. Localização das estações amostrais ao longo do litoral norte do Espírito Santo para o monitoramento da praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce.



Quadro 17. Coordenadas das estações amostrais para o monitoramento da praia e antepraia adjacentes à desembocadura do rio Doce. Coordenadas em UTM (fuso 24K).

| Estações amostrais | Leste | Sul |
|----------------------------------|--------------|------------|
| Aracruz 1: Refúgio | 379908,15 | 7787892,37 |
| Aracruz 2: Padres | 382269,99 | 7795558,41 |
| Doce Sul 1: Barra Do Riacho | 389346,33 | 7807767,56 |
| Doce Sul 2: Comboios | 398483,36 | 7818546,19 |
| Doce Sul 3: Regência | 407416,09 | 7824460,93 |
| Doce Norte 1: Povoação | 417863,32 | 7834350,26 |
| Doce Norte 2: Vila De Cacimbas | 426646,32 | 7857980,26 |
| Doce Norte 3: Pontal Do Ipiranga | 425784,32 | 7877396,26 |
| Doce Norte 4: Urussuquara | 423026,32 | 7897769,26 |
| Doce Norte 5: Guriri | 421308,32 | 7929528,26 |

Quadro 18. Relação dos parâmetros que serão analisados a partir do levantamento topobatimétrico do perfil praial e da coleta de sedimento.

| Parâmetros morfodinâmicos | Parâmetros geoquímicos | Parâmetros biológicos |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| Cotas dos perfis topográficos | Metais Total | Meiofauna bentônica |
| Cotas dos perfis batimétricos | Metais Biodisponível | Macrofauna bentônica |
| Granulometria do sedimento | - | - |
| Teor e composição dos carbonatos (se abundantes) | - | - |
| Ter e identificação dos minerais pesados | - | - |

5.4.1 Monitoramento morfológico e sedimentológico

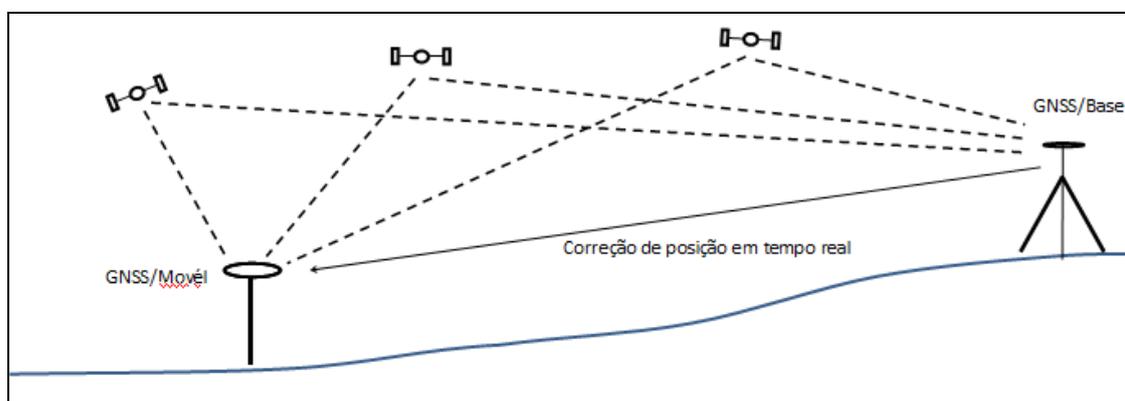
❖ Morfologia dos sistemas praias

Os perfis topobatimétricos são monitorados nas estações pré-determinadas (Figura 38 e Quadro 17). Os perfis são levantados a partir de um referencial fixo (marco geodésico) situado além do limite do pós-praia e se estendem até o limite da antepraia média, correspondente à profundidade de fechamento (isóbata de 10 m).

Os marcos geodésicos devem ser construídos em concreto armado e instalados preferencialmente em locais onde o substrato seja estável e não permita o deslocamento do marco ao longo do tempo. Os mesmos devem ser enterrados no substrato, acomodados sobre uma “cama” de concreto, e uma placa de identificação deve ser fixada em sua superfície. Estas estruturas devem ser instaladas em locais de fácil acesso e livre de cobertura vegetal ou qualquer outro obstáculo que impeça a visagem de satélites. Com o intuito de obter as coordenadas geodésicas dos marcos, é realizado previamente um rastreamento de longa duração. Para tal é instalado sobre o marco, com o auxílio de um tripé, um receptor GNSS, que armazena as coordenadas medidas pelo aparelho ao longo de 4 horas de aquisição. O sistema geodésico de referência utilizado é o SIRGASS 2000.

O levantamento da porção emersa do perfil praial é realizado por meio de posicionamento espacial e altimétrico utilizando um GNSS com função RTK, que faz correções em tempo real entre o receptor fixo na base e o receptor móvel (rover). A correção do posicionamento em tempo real ocorre por meio da comunicação via sinal de rádio entre os receptores, permitindo que a base transmita ao receptor móvel a posição corrigida para o ponto que se deseja conhecer a posição (Figura 39).

Figura 39. Funcionamento de GNSS RTK.



Antes de cada levantamento, o GNSS base é instalado sobre o marco e, então, sua posição é aferida. Durante todo o levantamento topográfico o receptor móvel permanece acoplado ao bastão

com altura fixa. O bastão é posicionado sobre as feições do perfil praial e a sua posição e altimetria são coletadas. Simultaneamente é anotada a descrição da feição observada (duna, cordão, berma, face praial, máximo recuo e submerso). Para realização do levantamento topográfico é utilizada a configuração em modo RTK, desta forma o GNSS/móvel coleta os dados com correção em tempo real, não sendo necessário um pós-processamento dos dados.

O levantamento do perfil na zona submarina (antepraia) é realizado com o auxílio de uma embarcação dotada de posicionamento por GNSS/GPS e empregando ecobatimetria monofeixe com frequências de operação de 210khz/33Khz (dupla frequência), para obtenção da profundidade e da espessura da camada de lama. A navegação e a integração dos dados de posicionamento e profundidade são feitas pelo programa Hypack. O ecobatímetro utilizado é o Midas Surveyor da Valeport.

Com o intuito de garantir a precisão dos dados, antes da realização do levantamento deve ser planejado o posicionamento do transdutor e da antena GNSS/GPS na embarcação. Na sequência, com o auxílio de uma trena rígida, determina-se a distância entre a origem do sistema (transdutor) e a antena do GNSS/GPS. Esse processo de determinação das distâncias entre os sensores é chamado de medição dos off-sets. A aplicação dos off-sets é realizada antes dos levantamentos batimétricos e os parâmetros medidos devem ser inseridos no programa Hypack.

Antes de cada levantamento, deve ser realizada a calibração do ecobatímetro, que consiste na imersão de uma placa fixa à uma corda graduada (e. g. disco de Secchi) sob o transdutor do ecobatímetro. Este procedimento fornece ao equipamento uma profundidade conhecida para calibração do sistema.

Para a coleta de dados batimétricos utiliza-se, mais especificamente, a ferramenta Hypack Survey do programa Hypack. Esta ferramenta auxilia na navegação sobre o perfil planejado e integra os dados de posição fornecidos pelo GNSS/GPS e o valor de profundidade registrado pelo ecobatímetro. Os dados brutos são salvos na memória do computador portátil para processamento.

De uma forma geral, para o levantamento topobatimétrico são utilizados os equipamentos, materiais e acessórios descritos no Quadro 19.

Quadro 19. Materiais e equipamentos utilizados no levantamento topobatimétrico.

| Equipamento | Quantidade | Descrição |
|-----------------------|-------------------|--|
| Receptor GNSS (Base) | 1 | Antena utilizada para envio de correção de posicionamento em tempo real para o receptor Móvel |
| Receptor GNSS (Móvel) | 1 | Antena utilizada na determinação da posição do ponto de interesse. Recebe sinal via rádio, em tempo real, da correção de posicionamento da Base. |
| Antenas RTK | 2 | Antenas utilizadas para obter conexão por rádio entre os receptores |
| Ecobatímetro | 1 | Registro de profundidades |
| Computador de campo | | Integração dos dados de profundidade e posição |
| GPS de mão | 1 | Posicionamento dos perfis em terra |
| Barra de libração | 1 | Calibração do Ecobatímetro |
| Base Nivelante | 1 | Nivelar o receptor GNSS |
| Coletora | 1 | Configurar o receptor e coletar dados |
| Baterias | 4 | Bateria para os receptores mais backups |
| Carregadores | 2 | Carregador de bateria |
| Câmera Fotográfica | 1 | Câmera para registrar as atividades |
| Tripé | 2 | Suporte para estacionar o receptor sobre o ponto |
| Bastão Topográfico | 1 | Instrumento utilizado para realizar levantamentos com o GNSS/móvel fixo na extremidade |
| Trena | 1 | Utilizada para medir o offset do centro de fase do GNSS até o ponto no solo |
| Balizas | 3 | Utilizada para referenciar o alinhamento do perfil |
| Caderno de Campo | 1 | Caderno para Anotações de Campo |

❖ Sedimentologia dos sistemas praias

Ao longo do perfil praias emerso são coletadas amostras de sedimento na face praias e na berma. Na face praias, é coletado apenas o sedimento superficial por raspagem, enquanto que na berma devem ser coletados os sedimentos superficiais e subsuperficiais, a partir da abertura de uma pequena trincheira (testemunho) de aproximadamente 1 m. O número total de amostras coletadas

na berma é função do número de fácies sedimentares encontradas ao longo do testemunho, isto é, uma amostra para cada faciologia. Se a trincheira apresentar homogeneidade faciológica, devem ser coletadas no mínimo 3 amostras (30 em 30 cm), além da amostra superficial. O sedimento coletado deve ser acondicionado em sacos plásticos identificados com o nome da estação amostral, a localização do ponto de coleta ao logo do perfil topográfico (berma ou face), tipo de coleta (superficial ou subsuperficial-testemunho) e a data da amostragem.

Ao longo do perfil praiial submerso são coletadas amostras superficiais nas profundidades de 5 e 10 m utilizando o amostrador de fundo do tipo Van Veen. O alinhamento da embarcação em relação ao perfil topobatimétrico é realizado por meio do software de navegação Hypack e seu posicionamento quanto a profundidade é realizado a partir dos dados obtidos durante o levantamento batimétrico. O amostrador é lançado na lateral do barco e içado a bordo manualmente. O sedimento coletado é transferido para uma bandeja, onde é quarteado e, então, transferido para sacos plásticos identificados com o nome da estação amostral, a localização do ponto de coleta ao logo do perfil batimétrico (profundidade) e a data da amostragem.

As amostras de sedimento, coletadas na porção emersa e submersa da praia, são encaminhadas ao Laboratório de Sedimentologia da Universidade Federal do Espírito Santo para análise granulométrica, teor e composição dos carbonatos, se abundantes, e teor e identificação dos minerais pesados.

5.4.2 Monitoramento da fauna bentônica

As coletas são realizadas em dez estações amostrais nas diferentes faixas de praia: antepraia (infralitoral), face praia (mesolitoral) e na berma (supralitoral), sempre em maré baixa de sizígia. Em cada estação, são realizados três transectos, distantes cerca de 50 m entre eles, onde coleta-se amostras nos quatro níveis: supralitoral, mesolitoral superior, mesolitoral inferior e infralitoral. Em cada um dos níveis de cada transecto, é coletada uma amostra de macrofauna e uma amostra de meiofauna, totalizando 12 amostras de cada componente bentônico por estação amostral. Dados de salinidade e temperatura da água do mar são registrados em campo com refratômetro e termômetro. As anotações desses dados são inseridas na planilha de campo.

❖ Macrofauna

As amostras são tomadas com coletores cilíndricos de 15 cm de diâmetro e enterrados a 20 cm de profundidade. Todas as amostras da macrofauna são lavadas em água do mar no próprio campo, em malha de 0,5mm de abertura. Após serem lavadas, são acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados, fixadas em álcool 96% e colocados em caixas para o transporte.

❖ Meiofauna

Para a meiofauna as amostras são coletadas com coletores cilíndricos de 2 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade. São diretamente acondicionadas em frascos plásticos etiquetados e fixados em solução de formalina a 10%. Em laboratório, adiciona-se corante rosa de bengala às amostras para melhor visualização dos organismos no momento da triagem.

Para anelídeos intersticiais, em cada um dos 10 pontos selecionados, o sedimento é coletado com auxílio de uma pá (diretamente da superfície no infralitoral e mesolitoral inferior – área úmida; e em um pouco mais profundos, onde se encontra areia úmida, para o mesolitoral superior e supralitoral), colocado em um balde com 1/4 sedimento, 1/4 de água do mar e 1/4 de solução de cloreto isotônico (ajustada entre salinidades 30-35), deixando descansar/relaxar por 5 minutos, mexido e deixando a areia decantar (~5-10 segundos) e passando o sobrenadante na malha de 0,063 mm de abertura, repetindo 3 vezes esse processo. O que fica retido é lavado com água do mar novamente e colocado em potes plásticos de 120 ml etiquetados.

5.5 ANEXO 5. ALTERAÇÕES ECOLÓGICAS NA DINÂMICA DOS MANGUEZAIS E VEGETAÇÃO DE RESTINGA SOB INFLUÊNCIA DOS SEDIMENTOS PROVENIENTES DO RIO DOCE

5.5.1 Manguezal

❖ Monitoramento da fitossociologia da Vegetação

A estrutura florestal dos manguezais será realizada nas porções baixo, médio e alto estuário com estabelecimento de parcelas fixas nos bosques de franja e bacia. A caracterização estrutural da vegetação será realizada em 9 áreas de influência direta e indireta da pluma do rio Doce. A metodologia está dividida em duas partes complementares: a amostragem em campo e as atividades de análise em laboratório. Para cada área, o número de parcelas fixas foi definido de acordo com a extensão dos manguezais em cada estuário (Figura 40 e Tabela 8).

Figura 40. Malha amostral Anexo 5 (Manguezal e Restinga)

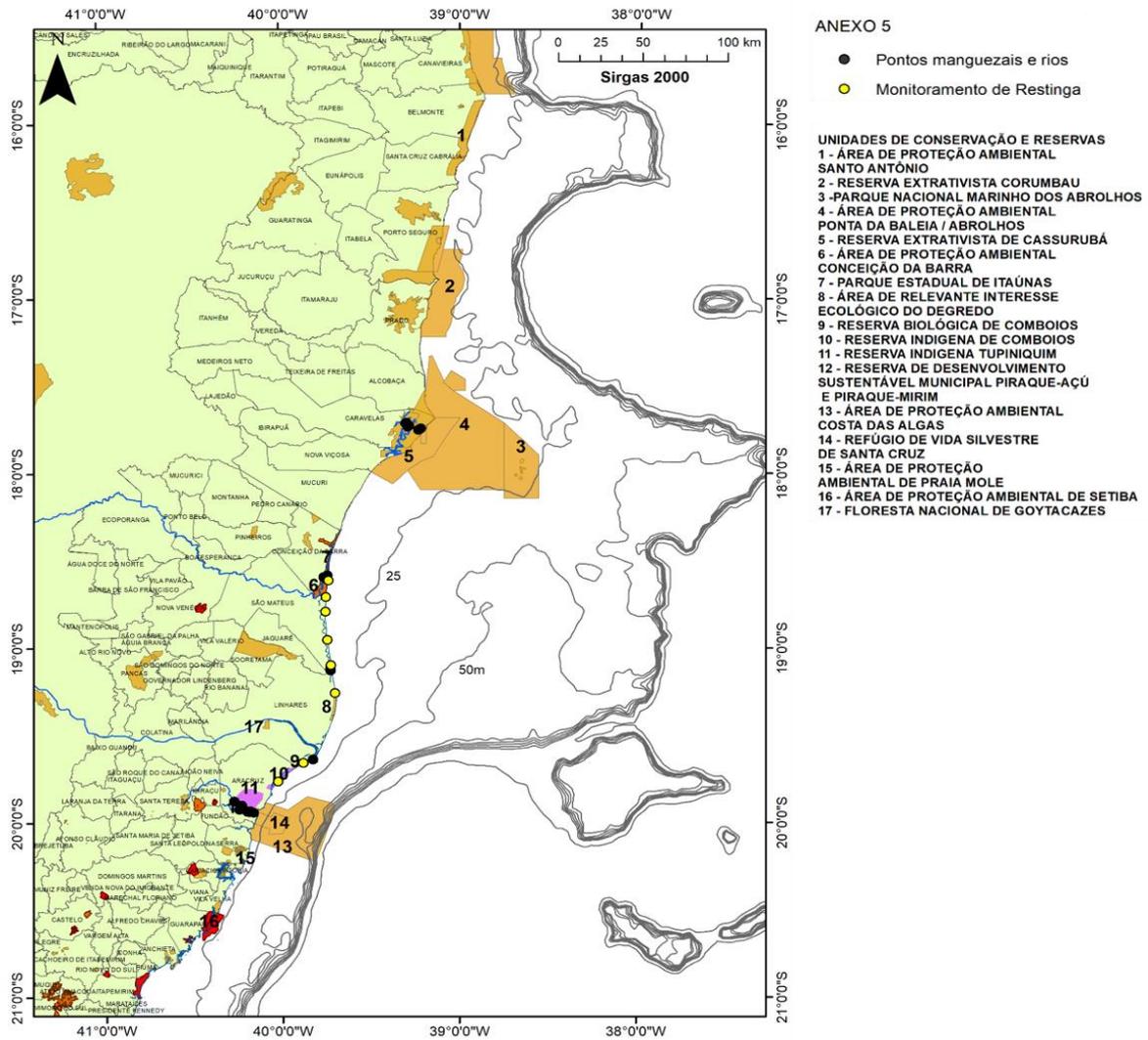


Tabela 8. Áreas de monitoramento e número de parcelas fixas nos manguezais.

| Município | Áreas | Número de parcelas fixas |
|--------------------|------------------------------------|--------------------------|
| Aracruz | Rio Piraquê -Mirin | 12 |
| Aracruz | Rio Piraquê -Açu | 12 |
| Aracruz | Costa das algas | 6 |
| Aracruz | Barra do riacho | 6 |
| Linhares | Foz do Rio Doce (Regência) | 3 |
| São Mateus | Urussuquara | 6 |
| São Mateus | Estuário Rio Mariricu (Barra Nova) | 6 |
| Conceição da Barra | Estuário do Rio São Mateus | 12 |
| Caravelas | Estuário do Rio Caravelas | 12 |

Para a caracterização estrutural da vegetação será adotado o método de parcelas (com 3 réplicas por ponto no estuário, quando possível), seguindo-se a metodologia descrita por Schaeffer-Novelli & Cintron (1986). O tamanho da parcela será determinado de acordo com a densidade da floresta, de forma a ser amostrado um número representativo de indivíduos (árvores, no mínimo 30), considerando-se a homogeneidade em termos de características estruturais (composição de espécies e desenvolvimento estrutural dos indivíduos), conforme recomendações de Cintron & Schaeffer-Novelli (1984) e Estrada (2009). Em cada parcela, todos os indivíduos serão identificados em nível de espécie e terão sua altura e diâmetro dos troncos à altura do peito (DAP) medidos ou altura igual a 1,30 metros. Para delimitação das parcelas será utilizada bússola, estacas de pvc e trenas de 50m. Nestas parcelas serão obtidos os seguintes atributos estruturais: diâmetro do tronco à altura do peito (DAP), altura e número de troncos dos indivíduos, além da identificação da espécie e a condição (vivo ou morto) de cada tronco. Será ainda realizada a contagem de jovens e de plântulas das diferentes espécies de mangue.

Os indivíduos também serão descritos quanto à condição de cada tronco como vivos ou mortos e em ambas condições terão sua altura mensurada. Quando monitorados em longo prazo, os parâmetros estruturais permitem identificar alterações na dinâmica populacional. Desta forma, em cada parcela, o incremento em diâmetro do caule será monitorado em cinco árvores utilizando-se dendrômetros. Este equipamento será utilizado nas árvores com diâmetro acima de 15 cm buscando avaliar as diferentes classes de diâmetro da parcela e também a posição da árvore na parcela (mais frontal ou mais interna).

Cada parcela será georeferenciada com emprego de RTK (Marca Trimble modelo R4Base) com precisão de 3,5 mm de erro horizontal. Nas condições em que o emprego do RTK não for possível, será utilizado GPS de mão. A salinidade e tempo de inundação de cada área serão aferidos da mesma forma que em "Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e

Piraquê”, como demonstrado abaixo. A seguir será apresentada uma síntese dos parâmetros estruturais que serão avaliados:

- Diâmetro à Altura do Peito (DAP)

É uma das mais simples formas de levantar a caracterização florestal e quantificar a estrutura arbórea. As estimativas de diâmetro sempre consideram a árvore como sendo uma circunferência. Será considerado um indivíduo todo tronco que emergir isoladamente do substrato e como indivíduo contendo um ou mais troncos quando o caule se bifurcar após emersão. Os indivíduos serão numerados e classificados por espécie e identificados em relação ao seu diâmetro de acordo com o número de troncos.

Por convenção, o diâmetro é medido a 1,30m do solo (altura do peito do observador sendo chamado de dap), o valor é obtido através de uma fita graduada em unidades de π (3,1416cm) e todas as árvores (vivas ou mortas) que possuam condição serão medidas para futura classificação segundo classes de dap que serão definidas de acordo com a distribuição de frequência de troncos para cada parcela. Em casos de deformidade do tronco da árvore pode-se deslocar a medida para 10 cm acima do estipulado no método evitando-se assim erros por troncos deformados. Indivíduos de *Rhizophora mangle* terão seu diâmetro obtido acima da última raiz escura. A altura de leitura do diâmetro será demarcada para acompanhamentos subsequentes. Cada árvore terá uma etiqueta numérica para monitoramento futuro. A avaliação de diâmetro nos indivíduos mortos deverá constar se o tronco possui ainda córtex ou somente o sistema vascular, esta informação é importante para determinar o tempo de mortalidade dos indivíduos nas florestas de manguezal.

- Altura

Altura total do indivíduo é a distância vertical linear entre solo e a base da folha mais alta da árvore. Esta variável fundamental é obtida, com o auxílio do telêmetro ótico, hipsômetro (digital ou analógico), vara telescópica ou régua graduada (as duas últimas para árvores de pequeno porte), de todas as árvores que possuam DAP, incluindo-se nesta avaliação os indivíduos mortos. A altura dos mortos deverá ser obtida independente do tipo de morte (natural ou induzida), definindo se houve corte e em que altura isto ocorreu.

- Banco de jovens

Os parâmetros ligados à avaliação da resiliência das florestas serão obtidos pela contagem de indivíduos em estágio de plântulas e jovens presentes no sub-bosque da floresta. Serão identificados por espécie e caracterizados por possuírem altura inferior a 1 metro ou pela impossibilidade de medição nos critérios definidos pelo DAP. A contagem será realizada por espécie. Quando houver um número elevado de plântulas, as parcelas serão divididas em quadrats iguais (4) e será sorteado aleatoriamente o quadrat para contagem. Se houver plântulas agregadas em um local exclusivo serão definidos dois quadrats.

❖ Monitoramento da Produtividade Primária

- Material vegetal

Para as medições de fluorescência da clorofila a fotossíntese e pigmentos fotossintéticos, definiu-se um padrão de amostragem, consistindo na quantificação dos dados em 6 folhas consideradas como jovens e completamente expandidas, sem indícios de senescência. Para atender a este padrão, serão amostradas as folhas do 2º par a partir do ápice para a base do ramo ao acaso. Estas réplicas serão obtidas de 10 indivíduos jovens (amostras) de *R. mangle* com até 2 metros de altura. Estes indivíduos receberão um laque de identificação possibilitando que sejam monitorados os mesmos indivíduos bimensalmente. Quando a espécie estiver ausente na parcela, será selecionada aquela dominante, seguindo o mesmo padrão de amostragem descrito.

Informações adicionais: Considerando que o horário do dia em que as coletas são feitas pode influenciar os resultados obtidos, a aquisição dos dados será feita sempre no mesmo intervalo de tempo em todas as parcelas. Variações dos fatores ambientais que influenciem na intensidade de luz, como a ocorrência de cobertura do céu com nuvens ou o auto sombreamento do dossel, serão anotados no momento da coleta de dados. Como método padrão, as medições de fotossíntese e de pigmentos fotossintéticos serão feitas nas mesmas folhas utilizadas para a aquisição dos dados de fluorescência da clorofila a.

Antes de serem coletadas as folhas terão sua superfície foliar quantificada por meio do medidor de área foliar (ADCAM350) que permitirá a coleta de dados biométricos das folhas: área, área média, acumulada, área doente, comprimento, largura, perímetro, fator de forma e razão. Otimizando as análises interpretativas da qualidade do indivíduo e sua variabilidade sazonal.

- Fluorescência da Clorofila a

As medidas da fluorescência da clorofila a serão obtidas entre 08:00 e 10:00 horas utilizando-se o fluorômetro portátil Handy-PEA (Hanstech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). As folhas serão previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos (FALQUETO et al., 2008) utilizando-se cliques foliares (Hansatech Instruments, UK) para a oxidação completa da cadeia de transporte de elétrons (MAXWELL et al, 2000). A intensidade de fluorescência em 50 μ (considerado como F0), 100 μ s, 300 μ s, 2 ms (FJ), 30 ms (FI) e a fluorescência máxima (Fm) serão registradas e utilizadas para os cálculos dos parâmetros do teste JIP.

- Fotossíntese

As medições serão realizadas entre 08:00 - 11:30 horas utilizando-se um medidor portátil de fotossíntese (IRGA) modelo LCI (ADC, Bio Scientific Ltd. Hoddesdon, England). Os seguintes parâmetros serão analisados: temperatura foliar (T) em °C, concentração interna de CO₂ (C_i - μ mol m⁻²s⁻¹), transpiração (E - mmol m⁻²s⁻¹), condutância estomática (g_s - mol m⁻²s⁻¹), assimilação de CO₂ (A - μ mol m⁻²s⁻¹). A estimativa da eficiência do uso da água (QUE - μ mol CO₂/mmol H₂O) será

calculada e determinada como: eficiência intrínseca no uso da água ($WUE_{int} - A/gs$) (SOBRADO, 2005) e eficiência instantânea no uso da água ($WUE_{inst} - A/E$) (KRAUSS et al., 2006).

- Extração e separação dos pigmentos fotossintéticos e derivados esverdeados

Após as medições da fluorescência da clorofila *a* e da fotossíntese, as folhas serão coletadas e congeladas em nitrogênio líquido e conservadas à temperatura de $-80^{\circ}C$ em ultrafreezer portátil (Shuttle™ Model ULT-25NE) até o processamento.

❖ Diagnóstico Sobre a Fauna do Manguezal

- Parâmetros populacionais de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi*

A pesquisa sobre dinâmica populacional envolverá amostragens bimensais para as duas espécies de caranguejo estudadas. A pesquisa dos parâmetros populacionais de *U. cordatus* envolverá a delimitação de parcelas no manguezal com predomínio de mangue-vermelho (*Rhizophora mangle*), onde predominam os caranguejos com tamanho comercial (DIELE 2000, SCHMIDT et al. 2009, WUNDERLICH & PINHEIRO 2013), sempre que possível. Em cada área, serão abertas parcelas permanentes de 5x5 onde estas serão georeferenciadas e associadas às parcelas de monitoramento da vegetação (contíguas as mesmas) e será realizada a contagem e medição das aberturas de tocas de caranguejo-uçá com um paquímetro modificado (SCHMIDT et al. 2008a), sendo os valores de diâmetro de abertura de toca transformados em valores de largura de carapaça por meio de regressão linear, conforme Schmidt et al. (2008a). Adicionalmente serão registradas também tocas tapadas, tocas vazias e caranguejos mortos, sempre que possível serão identificados rastros que possam indicar o sexo do habitante da toca.

A pesquisa dos parâmetros populacionais de *C. guanhumi* envolverá a delimitação parcelas nas áreas de bacia e apicum, onde predominam os guaiamuns com tamanho comercial (Schmidt et al. 2008b). As parcelas terão 5x5 extensão na interface com o manguezal adjacente e serão marcadas nos seus extremos com lacres, georeferenciadas e fotografadas. O método envolverá a contagem e medição das aberturas de tocas de guaiamum com um paquímetro modificado (SCHMIDT et al. 2008a,b). Em cada quadrado serão instaladas 10 armadilhas de madeira do tipo "ratoeira" dispostas em tocas escolhidas ao acaso. Os guaiamuns capturados terão o sexo identificado, serão medidos com um paquímetro (largura e comprimento de cefalotórax) e soltos no mesmo local. Caso a correlação entre diâmetro de abertura das tocas e largura dos guaiamuns habitantes seja forte, os dados serão transformados por regressão linear, a exemplo de como será feito com *U. cordatus*. Adicionalmente, serão registradas também tocas tapadas, tocas vazias e caranguejos mortos.

Duas vezes ao ano (inverno e verão) serão coletados aleatoriamente, ao longo do estuário, 100 exemplares de caranguejos para aferição da estrutura da população e para que estes dados sejam comparados com os dados de estrutura obtidos por técnica indireta de avaliação, reportada acima. A técnica empregada nesta etapa será de captura e soltura. Estes exemplares serão coletados por catadores profissionais e terão seu comprimento e largura aferidos por meio de paquímetro digital.

Cada exemplar terá seu sexo e condição de vida anotados para determinação da razão sexual e para avaliação do período de reprodução. Alguns exemplares serão encaminhados para uma equipe responsável para realização de análises ecotoxicológicas.

- Fecundidade de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guanhumi*

Anualmente, 10 fêmeas ovadas de *U. cordatus* e de *C. guahumi* serão capturadas aleatoriamente nas parcelas e serão transportadas em sacos de estopa até o laboratório de Ecologia do Ecosistema Manguezal localizado na Universidade Federal do Espírito Santo – campus São Mateus.

- Riqueza de espécies de *Brachyura* (Decapoda)

A pesquisa envolvendo a riqueza de espécies dos caranguejos dos manguezais ocorrerá bimensalmente, durante a baixa-mar na SRV Santa Cruz. Serão delimitadas 6 parcelas no bosque de franja onde seus extremos serão demarcados com lacres, georreferenciadas e fotografadas. Para a amostragem dos caranguejos serão coletados segundo a metodologia modificada proposta por Masunari (2006). Em cada área será sorteado um local onde será feita 3 parcelas de 10,0 m² seguindo o gradiente da margem do rio (um metro após a margem) ao fim do bosque, caso o bosque tenha menos que 30 metros as parcelas serão feitas lateralmente uma às outras. Os caranguejos serão coletados manualmente por revolvimento da toca por dois coletores, com um esforço amostral de 30 minutos/parcela, de acordo com a metodologia usada por Araújo (2014). Esse método é o que apresenta maior acurácia, quando comparado ao método de observação (subestimação) ou contagem de tocas abertas (superestimação) (MACIA et al. 2001, SKOV & HARTNOLL 2001). Cada exemplar será coletado e acondicionado em sacolas plásticas com álcool, numeradas e identificadas por coleta e área, para posterior classificação taxonômica e sexagem em laboratório. Sempre que possível serão fotografados em campo para preservação da coloração original da carapaça.

❖ Diagnóstico de Contaminação da Vegetação do Manguezal por Metais

- Metais

Serão retiradas manualmente 6 folhas maduras por indivíduo de *Rhizophora mangle*, completamente expandidas, duas por cada um dos quatro quadrantes. As folhas serão coletadas à meia altura da planta. No total, serão amostradas 10 plantas por parcela. As folhas serão acondicionadas em sacos de papel identificados e, se necessário, previamente limpas utilizando-se um pincel limpo. A secagem das folhas será feita em estufa de circulação forçada a 65°C até peso constante. As amostras serão moídas, acondicionadas em envelopes de papel e, em seguida, encaminhadas para laboratório especializado.

Serão evitadas folhas danificadas, com manchas, doenças ou predação. As amostragens serão feitas antes do início da floração e após períodos de chuva, as coletas serão feitas após 48 h de estiagem.

- Sedimentos

A amostragem de sedimento será feita em locais de baixa energia do agente transportador (água). Nessas condições ocorre máxima sedimentação, ideal para se encontrar compostos adsorvidos aos sedimentos.

A malha amostral não regular será instalada e delimitada de acordo a avaliação prévia da área e escolha dos pontos que se encontram em uma transeção que vai desde a margem do rio até o contato com o mangue, tendo a fonte pontual que fornecerá uma contaminação decrescente e a dinâmica das marés associada à variação do micro-relevo que produzirá zonas de acúmulo da contaminação. Para georreferenciamento da área será utilizado GPS de alta precisão.

As amostras de sedimento serão coletadas das zonas entremarés e dentro dos manguezais maduros. Semestralmente serão coletadas 75 amostras de sedimentos (100 g) em todas as áreas durante 1 ano de trabalho. Exceto a área da Foz do Rio Doce em Regência que serão coletadas 100 amostras para a implantação da malha amostral irregular.

As coletas das amostras de sedimento serão feitas por meio de coletores constituídos por um tubo de PVC, de pequeno diâmetro (5-10 cm) e curtos (< 1m). Os tubos serão inseridos manualmente, utilizando-se, em caso de necessidade, um martelo especialmente adaptado. O tubo deverá ser fechado, em sua extremidade superior, após a introdução no sedimento e, após sua retirada, a extremidade inferior também deverá ser tampada.

Os pontos de amostragem ao longo de um curso d'água deverão compreender coletas feitas próximas à margem, enquanto a existência de sedimentos permitir, já que a distribuição dos sedimentos pode ocorrer em bandas estreitas ao longo do canal e sob a forma de acumulações nos locais de baixa energia.

A profundidade de penetração será medida antes da retirada e da divisão em subamostras. As amostras serão mantidas em posição vertical até o momento de serem subamostradas. A retirada das amostras será feita o mais rápido possível, para evitar o risco da consolidação na parede do amostrador. A cada subamostra retirada, será anotada a profundidade e a descrição de cada camada sedimentar (cor, textura, etc.). As amostras serão fotografadas imediatamente após a coleta, a fim de registrar as características visuais do sedimento.

Uma vez coletadas, as amostras serão acondicionadas em sacos plásticos resistentes buscando-se gerar um mínimo de perturbação na superfície do sedimento e encaminhadas ao laboratório. As amostras serão mantidas em ambiente refrigerado.

Para análise de metais pesados, as amostras serão coletadas com o auxílio de espátula de plástico, raspando-se apenas os primeiros centímetros (0-5cm) da amostra de sedimento, obtendo-se, assim, apenas o sedimento superficial, após esta coleta, será introduzido amostrador para avaliar a camada abaixo dos 10 cms e que irá caracterizar o sedimento pretérito ao evento de chegada da lama na linha de costa capixaba.

❖ Caracterização da dinâmica estuarina nos Rios São Mateus, Mariricu e Piraquê

- Monitoramentos de fluxos d'água

Serão realizadas 12 campanhas de monitoramento com ADCP, com periodicidade mensal, em duas seções nos locais especificados. As medições serão realizadas durante 12 horas, para acompanhar o ciclo de maré. Próximos aos locais de medição serão instalados marégrafos, para acompanhamento da variação do nível d'água. Os resultados obtidos serão utilizados para caracterização do ambiente e no estudo de modelagem numérica.

- Tempo de Inundação

O monitoramento da condição de inundação de cada área/parcela, será realizado semestralmente durante 26 horas, utilizando o sensor de nível da água (HOBO® U20 Titanium Water Level Logger). Este sensor coleta informações sobre a pressão absoluta local e a conversão dos dados de pressão em nível da água é executado pelo programa Hoboware®. As medições serão feitas em maré sizígia.

- Salinidade

A salinidade da água do solo será determinada em todas as coletas, a partir de três réplicas. Para isso serão feitas três aberturas no sedimento com aproximadamente 30 cm de profundidade e neles inseridos canos de policloreto de vinila (PVC) que ficarão fixo em cada ponto de coleta. Os canos apresentam 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, os 20 cm de sua base são perfurados em toda sua volta sendo o fundo, em contato com o sedimento, vedado com tampa de PVC. A porção superior será fechada com tampa de PVC para evitar a entrada de água da chuva e contaminação.

O registro da salinidade será realizado com a abertura da tampa superior e coleta da água armazenada no interior do cano de PVC. Após a coleta da água, a leitura da condutividade será feita com um medidor portátil de condutividade modelo HQ40D (HACH Company). Posteriormente esses valores serão transformados em salinidade.

Nas seções de medição de correntes e em pontos mais internos dos estuários serão feitas perfilagens de salinidade, com uso de sonda multiparâmetros. As medidas serão feitas continuamente, a partir da embarcação, navegando a partir da foz, com finalidade de avaliar a variação de salinidade durante o ciclo de maré.

- Correntes

Medições de correntes serão realizadas na foz dos estuários São Mateus, Barra Nova e Piraquê-Açu, com medições horárias, durante 12 horas. As medições serão realizadas com ADCP, acoplado à embarcação, para realização de transectos. A velocidade da embarcação deverá ser adequada de forma a garantir a qualidade dos dados. Em cada seção serão feitas duas transversais, de margem a margem.

- Maré

Serão instalados sensores de pressão, um em cada estuário, com finalidade de acompanhamento de níveis d'água. Os registros serão feitos a cada 5 minutos e armazenados em data logger. Os dados serão coletados mensalmente, por ocasião das campanhas de monitoramento. Nestas ocasiões será verificada a qualidade das leituras armazenadas, comparando com as leituras obtidas nas réguas limnimétricas instaladas junto aos sensores de pressão.

- ❖ Mapeamento dos habitats das espécies de *Ucides cordatus* e *Cardisoma guahumii* nos estuários dos Rios Piraquê (Açú e Mirin), Rio Riacho, Barra Seca, Mariricu, São Mateus e Caravelas e espécies de decápodes do manguezal de franja do RVS de Santa Cruz

A análise que pretende ser apresentada neste trabalho integra informações obtidas por meio de imagens de resolução média e de alta resolução de sensoriamento remoto numa perspectiva multitemporal, diagnosticando os padrões de uso e ocupação, avaliando os principais impactos da área, juntamente com a fisiografia da região. A utilização de imagens de alta resolução permitirá a geração de uma cartografia mais precisa com ajuda da comunidade local, facilitando a quantificação da evolução da paisagem e, conseqüentemente, a tomada de decisões.

Cada parcela terá quatro (4) coordenadas geográficas no mínimo obtidas através de um GPS Trimble de pós-processamento. Com essas coordenadas, estimamos a distância entre parcelas e a distância das parcelas ao ponto mais próximo geodésico (levantamento preciso por RTK). Ainda não foi escolhido o método de levantamento a ser utilizado pelo RTK, pois não conhecemos no campo as áreas a serem levantadas, é possível que seja realizado um posicionamento relativo cinemático, Segundo Monico (2000), o posicionamento relativo cinemático pode ocorrer da forma pós-processada quando um receptor ocupa uma estação de coordenadas conhecidas enquanto o outro se desloca sobre as feições de interesse. As observações simultâneas dos dois receptores geram as duplas diferenças, onde vários erros envolvidos nas observações são reduzidos.

Pode-se também obter o posicionamento relativo cinemático em tempo real, mas para que as coordenadas da antena sejam determinadas em tempo real é necessário que os dados coletados na estação de referência sejam transmitidos para a estação móvel necessitando de um link de rádio.

Um sistema RTK (Real Time Kinematic) é composto por dois receptores (de dupla ou simples frequência) com as respectivas antenas e um link de rádio (para transmitir e receber correções e/ou observações da estação de referência). Seu uso é limitado a distâncias menores que 4,3 Km (MONICO, 2005).

Imagens de Satélite das áreas de estudo em formato digital (CD-ROM) e imagens Landsat TM, para identificação das áreas a serem mapeadas em contexto geral (imagens Landsat TM, gratuitas) vão permitir gerar uma base em escala média para visualização de todas as áreas simultaneamente. Imagens de alta resolução (uma imagem ao ano para cada área de estudo), correspondentes às bandas multiespectrais (1 a 3) e infravermelho próximo (4) geo-referenciadas e corrigidas geometricamente pelo algoritmo de interpolação de filtragem convolução cúbica (ortoretificada e georreferenciada) pela própria empresa que fornece. Para verificar a precisão do georreferenciamento, uma base de contornos vetoriais de área de estudo no formato shapefile (*.shp) vai ser sobreposta a uma das bandas adquiridas. Vão ser gerados arquivos shapefile a partir da utilização de GPS pós-processado da Trimble, por caminhamento (linhas, pontos, áreas).

5.5.2 Restinga

A campanha ocorrida entre 17 e 19 de setembro objetivou localizar os pontos amostrais previamente estabelecidos pela TR nº 4. Em função de aspectos logísticos, de estado de conservação da vegetação e acesso, e em resposta as considerações da reunião da CTBio de 28 de agosto de 2018, os pontos de amostragem antes estabelecidos foram identificados e ajustados e, alguns deles, deslocados, como comunicado a coordenação técnica em 23 de setembro de 2019.

A malha amostral da área de Restinga é composta por oito estações com diferentes fitofisionomias a serem monitorados durante a execução deste subprojeto e estão indicados na Tabela 9.

Tabela 9. Coordenadas geográficas das oito estações amostrais da formação Restinga do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática I.

| ÁREA | UTM | | MUNICÍPIO |
|-------------------------------------|-------------|--------------|--------------------|
| | E | S | |
| PONTO 1 – APA Conceição da Barra-1 | 422469.00 m | 7940471.00 m | Conceição da Barra |
| PONTO 2 – APA Conceição da Barra-2 | 421428.00 m | 7934388.00 m | Conceição da Barra |
| PONTO 3 – Aldeia do Coco | 421079.00 m | 7921259.00 m | São Mateus |
| PONTO 4 – Barra Nova | 422303.00 m | 7903649.00 m | São Mateus |
| PONTO 5 – Pontal Ipiranga | 425441.00 m | 7879375.00 m | Linhares |
| PONTO 6 – Cacimbas | 422626.00 m | 7845708.00 m | Linhares |
| PONTO 7 – Regência-Tamar | 407394.00 m | 7824518.00 m | Linhares |
| PONTO 8 – Regência-Reserva Indígena | 402310.00 m | 7821618.00 m | Linhares |

Em cada um dos pontos de amostragem (Figura 41), os parâmetros (Tabela 10) serão avaliados nas três fitofisionomias: vegetação herbácea, arbustiva e arbórea. As amostragens serão mensais ao longo de doze meses. Sendo que nos dois primeiros meses de coleta a equipe responsável

pelas análises ecofisiológicas estará acompanhando as análises florísticas e fitossociológicas objetivando ampliar os conhecimentos sobre as espécies dominantes nas áreas de estudo.

Figura 41. Esquema do delineamento amostral apresentado na reunião do dia 28/08 para análises florísticas, fitossociológicas e ecofisiológicas da vegetação de Restinga

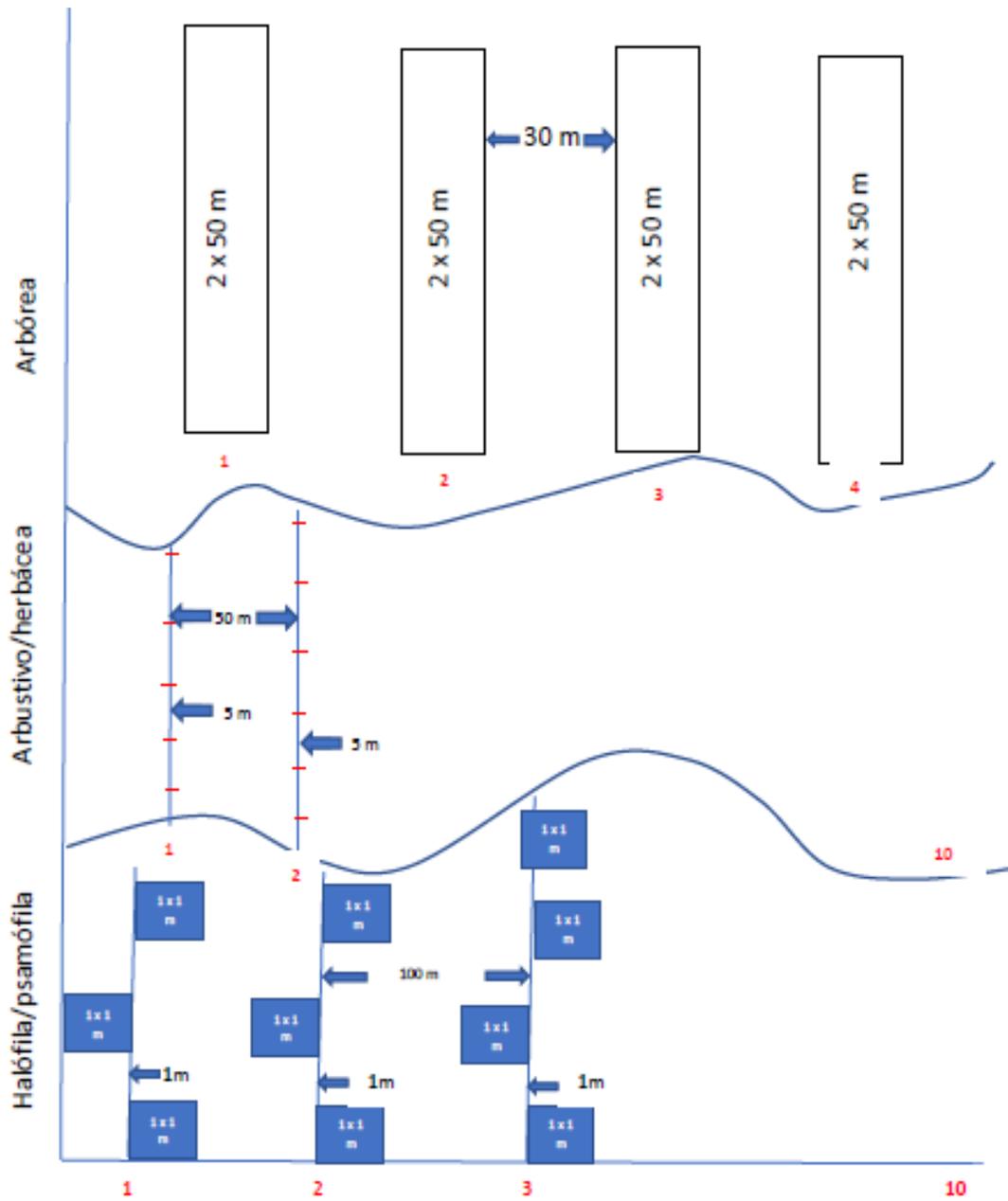


Tabela 10. Relação dos parâmetros do monitoramento do ecossistema Restinga.

| Parâmetros Florísticos | Parâmetros Fitossociológicos | Parâmetros Ecofisiológicos | Solo | Folha/Frutos |
|--|---|--|--|---|
| <u>Vegetação herbácea</u> | | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Inventário taxonômico • Registro fotográfico • Listagem das espécies inventariadas • Lista de espécies em estado de ameaça, exótica e naturalizadas | <ul style="list-style-type: none"> • Frequência absoluta • Frequência relativa • Dominância absoluta • Dominância relativa • Valor de Importância • Índice de Shannon • Índice de Pielou | <ul style="list-style-type: none"> • Fluorescência transiente • Fluorescência modulada <ul style="list-style-type: none"> • Trocas gasosas • Pigmentos fotossintéticos <ul style="list-style-type: none"> • Potencial hídrico • Metabólitos primários • Polímeros de parede • Sistema antioxidante • Anatro-estrutura | <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria • Matéria orgânica • Macronutrientes • Micronutrientes • Metais/Elementos traços | <ul style="list-style-type: none"> • Macronutrientes • Micronutrientes • Metais/Elementos traços |
| | | | | |

| Parâmetros Florísticos | Parâmetros Fitossociológicos | Parâmetros Ecofisiológicos | Solo | Folha/Frutos |
|--|---|--|--|---|
| <u>Vegetação arbustiva</u> | • | • | • | • |
| <ul style="list-style-type: none"> • Inventário taxonômico • Registro fotográfico • Listagem das espécies inventariadas • Lista de espécies em estado de ameaça, exótica e naturalizadas | <ul style="list-style-type: none"> • Frequência absoluta • Frequência relativa • Dominância absoluta • Dominância relativa • Valor de Importância • Índice de Shannon • Índice de Pielou | <ul style="list-style-type: none"> • Fluorescência transiente • Fluorescência modulada • Trocas gasosas • Pigmentos fotossintéticos • Potencial hídrico • Metabólitos primários • Polímeros de parede • Sistema antioxidante • Anatro-estrutura | <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria • Matéria orgânica • Macronutrientes • Micronutrientes • Metais/Elementos traços | <ul style="list-style-type: none"> • Macronutrientes • Micronutrientes • Metais/Elementos traços |
| <u>Vegetação arbórea</u> | | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Inventário taxonômico • Registro fotográfico • Listagem das espécies inventariadas • Lista de espécies em estado de ameaça, exótica e naturalizadas | <ul style="list-style-type: none"> • Frequência absoluta • Frequência relativa • Dominância absoluta • Dominância relativa • Valor de importância • Índice de Shannon • Índice de Pielou | <ul style="list-style-type: none"> • Fluorescência transiente • Fluorescência modulada • Trocas gasosas • Pigmentos fotossintéticos • Potencial hídrico • Metabólitos primários • Polímeros de parede • Sistema antioxidante • Anatro-estrutura | <ul style="list-style-type: none"> • Granulometria • Matéria orgânica • Macronutrientes • Micronutrientes • Metais/Elementos traços | <ul style="list-style-type: none"> • Macronutrientes • Micronutrientes • Metais/Elementos traços |

❖ Inventário da flora e da biota do solo

• Inventário Florístico

Em cada um dos pontos de amostragem, o inventário florístico será realizado por meio de caminhamento aleatório, nas áreas das linhas e parcelas, marcadas em vegetação herbácea, arbustiva e arbórea e fora delas, sendo delimitada, com auxílio de GPS, uma distância de cerca de 100m das mesmas. Espécimes férteis observados serão coletados, de um indivíduo por espécie, em cada fitofisionomia, em todas as áreas e em todas as expedições de campo, durante 12 meses, para que o máximo de material fértil seja coletado no período de estudo¹. Para cada espécime, serão coletados cinco ramos férteis (com folhas, flores e/ou frutos). Além disso, serão compiladas informações sobre a planta, como o hábitat, os estádios de floração e de frutificação, a ocorrência de outras populações, e outras observações ecológicas ou morfológicas pertinentes. Serão anotadas as coordenadas geográficas, com o auxílio de um GPS, e realizada a documentação fotográfica. No caso de indivíduos com frutos maduros, eles serão coletados para a carpoteca, para auxiliar a identificação das sementes.

Após a coleta, os espécimes, devidamente numerados, serão colocados em sacos de polietileno transparente, e posteriormente preparados para prensagem. A prensagem será realizada ao final do dia, acondicionando as amostras em folhas de jornal, que serão dispostas entre folhas de papelão corrugado e alumínio corrugado e, posteriormente amarradas com a corda entre os dois lados da prensa de madeira (Fidalgo & Bononi 1989). Frutos de grandes dimensões serão acondicionados em sacos de papel. As prensas montadas e os sacos contendo os frutos serão colocados para secagem em estufa de lâmpada. No último dia de campanha, o material coletado para a florística será retirado da estufa e transportado ao Herbário VIES, em Vitória, onde continuará o processo de secagem por aproximadamente cinco dias.

• Capacidade de recuperação da vegetação

Para a avaliação da capacidade de recuperação do ecossistema Restinga amostras do banco de sementes do solo serão realizadas coletas quadrimestrais, totalizando 3 coletas ao longo de 12 meses de trabalho. Em cada um dos 8 pontos amostrais será coletada uma amostra em cada uma das 3 fitofisionomias. Cada coleta constará de 3 amostras de solo.

O material será coletado aleatoriamente em cada um dos pontos amostrais com auxílio de um gabarito de madeira com dimensões de 50 x 50 e 5,0 cm de profundidade, totalizando um volume de 0,012 m³ por amostra.

¹ A coleta de material fértil, com flores e com frutos, é importante para a correta identificação dos espécimes a nível específico. O conhecimento fenológico é de suma importância para a compreensão da complexa dinâmica dos ecossistemas. Este tipo de informação não só permite explicar as relações das plantas com o clima e o meio edáfico, mas também é importante no estudo das relações entre plantas e os animais de uma comunidade. Por meio das observações fenológicas, será possível inferir, por exemplo, se está havendo alterações na frutificação das espécies após o desastre ambiental. Ausência ou diminuição na frutificação indica problemas na relação da planta com os polinizadores, que também podem ter sido afetados pelo desastre ambiental. Os dados fenológicos poderão acrescentar informações importantes sobre a dinâmica das restingas estudadas e estes poderão ser comparados com dados pretéritos, de áreas próximas de restinga, provenientes de materiais depositados em herbários.

As amostras serão identificadas em relação à estação amostral, data e fitofisionomia e acondicionadas em sacos plásticos pretos, devidamente identificadas e armazenadas em caixas térmicas sob refrigeração até transporte ao laboratório.

- Microbiota do solo

Para a análise da microbiota do solo 10 amostras de solos, em cada fitofisionomia dos oito pontos amostrais, serão coletadas junto ao sistema radicular das plantas, com auxílio de um trado calador. Cada amostra coletada será acondicionada em um saco plástico individualmente contendo informação sobre espécie vegetal sob a qual o solo foi coletado.

Para coleta de amostra do sistema radicular das plantas, a planta será cortada a 10 cm do solo, pois serão utilizadas raízes e também os primeiros centímetros do caule. As amostras serão retiradas com cuidado, de modo a obter o máximo de raízes. No caso das arbóreas, somente parte do sistema radicular será retirado. Cada amostra coletada será acondicionada em um saco plástico individualmente contendo informação sobre a espécie, estação amostral, data e fitofisionomia e acondicionadas em sacos plásticos pretos, devidamente identificadas e armazenadas em caixas térmicas sob refrigeração até transporte ao laboratório.

Na coleta de solos para análise do microbioma serão selecionados 10 pontos em cada fitofisionomia amostrada, considerando-se a espécie de maior incidência ou espécie considerada mais agressiva na colonização ou de maior rusticidade ou ainda, espécie que tenha habilidade fitorremediadora, de cada fitofisionomia. A coleta será realizada com auxílio de um trado calador e cada amostra coletada será acondicionada em um saco plástico individualmente contendo informação sobre o ponto de onde o solo foi coletado e outras informações acima descritas.

Para obter maior diversidade de amostras, será coletado o maior número possível de espécies de plantas, preferencialmente de diferentes gêneros e famílias. Cada uma das três fitofisionomia amostrada deverá ter no mínimo 10 amostras, totalizando, no mínimo 30 amostras por análise e por localidade amostrada, sendo as coletas realizadas semestralmente.

- ❖ Levantamento fitossociológico

Para o levantamento fitossociológico na vegetação herbácea será adotado o método de parcelas alternadas de Mueller-Dombois e Ellenberg (1974), consistindo em parcelas de 1 m² lançadas ao longo de uma linha perpendicular ao mar, obedecendo a alternância de lados e intervalos de 1 m. Em cada área serão estabelecidas dez linhas distanciadas entre si em 50 metros. As linhas serão estabelecidas com auxílio de trena de 50 m, estacas e barbante. Em cada parcela serão estimados visualmente de acordo com Brower e Zar (1977), os percentuais de área nua (AN) e área com cobertura vegetal (CV) das espécies encontradas. O comprimento dos transectos poderá variar conforme a distância entre o primeiro vestígio de vegetação e a transição com outro tipo de vegetação.

Para o levantamento da estrutura da vegetação arbustiva (aberta ou fechada) será utilizado o método de intercepto de linha (Mueller-Dombois e Ellenberg 1974). Com o auxílio de uma bússola serão demarcadas 7 linhas por toda extensão da vegetação, no sentido mar – continente, com uma distância de 50 m entre elas. A extensão da linha poderá variar de acordo com a largura da faixa de vegetação analisada. Os indivíduos lenhosos e herbáceos com altura igual ou superior a 50 cm que interceptarem as linhas, exceto lianas, serão incluídos na amostragem. Para cada indivíduo serão tomadas: a extensão do indivíduo interceptado pela projeção da linha e o maior diâmetro de copa perpendicular à linha. Pequenas interrupções de até 5 cm nas copas dos arbustos interceptados serão ignoradas. Serão coletadas através de caminhada aleatória e incluídas na listagem florística, espécies não contempladas pela amostragem, mas que obedecerão ao critério de inclusão adotado. Serão distribuídos dez pontos entre as unidades amostrais para mensurar a profundidade do lençol freático.

Para a avaliação da vegetação arbórea será utilizada o método proposto por Gentry (1991), enquadrado no Programa de Amostragem Rápida (Higgins e Ruokolainen 2004). Tal método foi utilizado em diversos estudos em florestas tropicais e sumarizado em Phillips e Miller (2002); sendo considerado eficiente para a estimativa da diversidade por fornecer uma visão mais abrangente da vegetação, pois incluem plantas jovens, árvores, arbustos, trepadeiras e hemiepífitas que geralmente não são amostrados em parcelas de árvores (Clinebell et al. 1995).

A amostragem será realizada ao longo de três transectos de 2 x 50 m, totalizando 0,03 há, estabelecidos perpendicularmente a uma linha base, distantes 30 m entre si, e 50 m da borda da floresta, para minimizar o efeito de borda e evitar a sobreposição de áreas amostradas. A amostragem será realizada em duas faixas de 1 m ao longo de cada linha mestra (50 m) orientada com bússola. Nos transectos serão incluídos todos os indivíduos com DAP igual ou superior a 2,54 cm, assim serão incluídos arbustos, árvores, palmeiras e lianas. No caso das lianas será registrado o maior diâmetro do indivíduo e não o DAP.

Todos os indivíduos receberão plaqueta numerada e terão suas circunferências (CAP) medidas com fita métrica. A altura de cada indivíduo será estimada visualmente, tomada com o auxílio de uma tesoura de poda alta (10 m), sempre pelo mesmo membro da equipe. Os indivíduos mortos também serão amostrados.

As espécies que crescerem no limite dos transectos serão incluídas desde que metade ou mais do seu caule estiver dentro do limite imaginário do transecto. Os indivíduos perfilhados acima do solo e abaixo da altura do peito (1,30 m) serão incluídos quando um dos seus ramos obedecer ao critério de inclusão, sendo anotado o CAP de todas as ramificações para o cálculo da área basal. As árvores com sapopemas, cujo alargamento das raízes se der acima de 1,30 m, terão seus diâmetros medidos 20 cm acima do alargamento. As lianas somente serão incluídas quando estiverem enraizadas (geralmente através de raízes adventícias) dentro do transecto (Peixoto e Gentry 1990).

Serão feitas coletas de material botânico provenientes da amostragem (quando férteis) e de vários pontos das áreas amostrais a fim de complementar a lista florística.

❖ Análises ecofisiológicas das espécies dominantes

As análises ecofisiológicas (in situ e em laboratório) terão início no terceiro mês quando então serão selecionados, no mínimo cinco indivíduos por espécie, considerando as fisionomias herbácea, arbustiva/herbácea e a arbórea, nas oito áreas de amostragem. Em cada uma das fisionomias serão analisadas cinco espécies elencadas pelo maior valor de importância (VI = FR + DoR), desde que estas ocorram em todas as oito áreas. Embora o parâmetro VI seja norteador desta seleção, outras espécies poderão ser eleitas para análise independentemente do seu valor de importância. Os indivíduos selecionados das espécies arbustivas e arbóreas devem estar na fase adulta (quando possível com flores ou frutos presentes no momento em que serão marcados) e indivíduos selecionados da mesma espécie devem estar localizados a, pelo menos, 2 metros de distância um do outro.

Trimestralmente o potencial hídrico das folhas (Ψ_w) das espécies amostradas será aferido na antemanhã e ao meio dia, em uma folha por espécime, utilizando uma câmara de pressão tipo Scholander, modelo 3000 (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Bárbara, Califórnia-USA).

As medições da fluorescência da clorofila a (transiente e modulada) e trocas gasosas seguirão protocolos padronizados e realizadas nas primeiras horas da manhã (entre 6 e 10 horas, horário solar) a fim de evitar depressões nos horários de maior incidência solar e maiores temperaturas.

Para as medições das trocas gasosas será utilizado um analisador de gás no infravermelho, portátil, (IRGA, modelo LCPro⁺, LCSD e LCProT, ADC BioScientific Ltd., England) para obtenção da taxa líquida de assimilação do CO₂ (A), a condutância estomática ao vapor de água (g_s) a transpiração (E), e a concentração intercelular de CO₂ (C_i). A condutância estomática será usada para quantificar a eficiência do uso da água durante as estações seca e chuvosa (Cavatte et al. 2012a, 2012b).

A fluorescência transiente OJIP da clorofila a será medida em folhas aclimatadas ao escuro até a completa oxidação dos centros de reação dos fotossistemas e em seguida submetidas a um pulso saturante de luz (3.000 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Utilizando-se um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments®, Kings Lynn, Norfolk, UK) seguindo orientações de Strasser e Strasser (1995) e Strasser et al. (2000; 2004). Nas mesmas folhas utilizadas para as medições da eficiência fotossintética serão avaliados os índices de clorofila total, utilizando-se um clorofilômetro portátil Mod. SPAD 502 (Minolta Sci.) segundo (Cassol et al. 2008).

Após as medições, amostras de folhas usadas na determinação dos índices de clorofila, fluorescência da clorofila e trocas gasosas e quando possíveis raízes, flores e frutos serão coletadas, acondicionadas em baixas temperaturas (gelo seco ou N₂ líquido) e levadas para o laboratório, onde serão armazenadas a temperatura de -80°C para análises posteriores.

Para as determinações morfoanatômicas, de cada indivíduo serão coletadas de 1 a 2 folhas adultas completamente expandidas, sem indícios de necrose, herbivoria ou quaisquer danos. As folhas serão coletadas inteiras, incluindo o pecíolo e transferidas para recipiente com tampa e solução fixadora de FAA 50 (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 50%, 2:1:18 v/v) (Johansen, 1940).

As amostras para análises bioquímicas e anatômicas, com exceção da determinação do sistema anti-oxidante, serão coletadas entre 8:00-10:00h. Por outro lado, para análises do estresse oxidativo, as amostras serão coletadas entre 12:00-14:00 h.

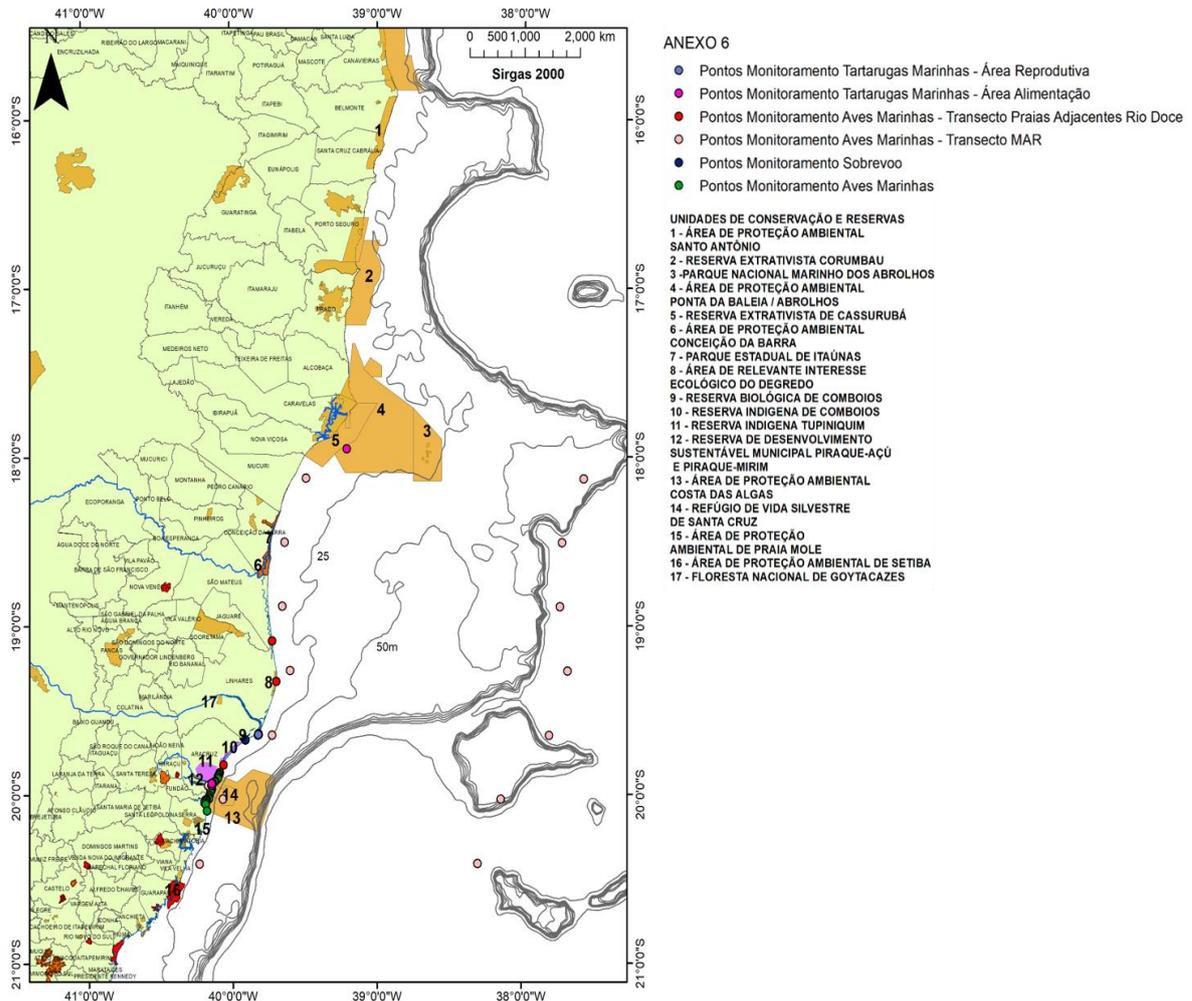
❖ Análises físico-químicas do solo e tecidos vegetais

Para a determinação físico-química e contaminação de metais pesados e elementos traços, semestralmente, cinco amostras de solo ao longo das áreas marcadas, das três fisionomias e em cada uma das oito estações amostrais, perfazendo 240 amostras de solo ao longo dos 12 meses. Somados a isso, amostras de material vegetal das cinco espécies dominantes serão coletadas nas três fisionomias e nas oito estações amostrais, em duas épocas do ano (semestralmente), totalizando assim também 240 amostras de tecido vegetal ao longo de 12 meses de coletas. Após a coleta, cada amostra será acondicionada em saco plástico escuro, individualmente, identificadas com etiquetas contendo informação sobre a espécie ou espécie associadas (no caso de solo), estação amostral, data e fitofisionomia, e acondicionadas em sacos plásticos pretos, devidamente armazenadas em caixas térmicas sob refrigeração até transporte ao laboratório.

5.6 ANEXO 6. MONITORAMENTO AMBIENTAL DE MAMÍFEROS, TARTARUGAS E AVES MARINHAS ASSOCIADOS À FOZ DO RIO DOCE

A malha amostral do Monitoramento da Megafauna está presente na (Figura 42).

Figura 42. Malha amostral Anexo 6 – Megafauna



5.6.1 Monitoramento com veículos aéreos não tripulados (drones)

O objetivo geral deste subprojeto é determinar e monitorar a associação de tartarugas, aves e mamíferos marinhos com micro-habitats costeiros, bem como tendências de agregação e deslocamento em áreas potencialmente impactadas ao redor da foz do rio Doce.

❖ Aspectos do Monitoramento

Os Drones são também conhecidos como Veículos Aéreos Não Tripulados (VANTs), Aeronave Remotamente Pilotada (RPA), ou Sistema de Aeronave Não Tripulada (UAS). Para as observações

feitas com os Drones deverão ser utilizados equipamentos como o Mavic 2 Zoom da fabricante chinesa DJI (Figura 43). O Drone é um quadróptero equipado com câmeras com capacidade de capturar vídeos em resolução 4K e capturar fotos com resolução de até 20 megapixels. É dotado de receptores GNSS (Global Navigation Satellite System), sistemas de estabilização de imagem, sensores para evitar colisões e tem sinal de rádio que permite que o aparelho voe a uma distância de até 08 km do controle remoto. Caso ocorra perda de link de comunicação com o controle remoto, o Drone retorna automaticamente para o local de partida sem necessidade de intervenção do operador até que o link seja reestabelecido.

Como margem de segurança, os Drones serão programados para percorrer no máximo 06 km do ponto de saída. Considerando que o Drone especificado tem a capacidade de realizar voos com até 31 minutos, e que a margem de segurança definida é de 30% da capacidade de voo, as missões terão até 21min de operação.

Figura 43. Drone modelo Mavic 2 Zoom, utilizado para monitoramento da megafauna na foz do rio Doce.



Para cada operação do Drone deverá ser obtido uma autorização do Departamento de Controle do Espaço Aéreo de acordo com instruções contidas na Circular de Informações Aeronáuticas (AIC-N21/10) de 23 de setembro de 2010. A equipe que pilotar os RPAs deverá estar previamente registrada na ANAC.

Para o manuseio do equipamento, deverão ser feitas aferições de equivalência entre o tamanho dos pixels registrados nas filmagens e fotos e distância real em diversas altitudes. Estabelecemos procedimentos de campo para ações de levantamento de imagens aéreas em áreas litorâneas e oceânicas sem ocupação humana permanente. Existem procedimentos de segurança, controle e comunicação a serem seguidas em campo para a atividade de monitoramento litorâneo com a utilização de RPA (Remotely Piloted Aircraft).

NOMENCLATURA UTILIZADA PARA VOO:

- AGL: Acima do Nível do Solo
- ANAC: Agência Nacional de Aviação Civil
- ANATEL: Agência Nacional de Telecomunicações
- ATM: Gerenciamento do Tráfego Aéreo
- ATS: Serviços de Tráfego Aéreo
- BRLOS: Além da Linha de Visada Rádio
- BVLOS: Além da Linha de Visada Visual
- CAG: Circulação Aérea Geral
- CINDACTA: Centro Integrado de Defesa Aérea e Controle de Tráfego Aéreo
- COM: Circulação Operacional Militar
- COMDABRA: Comando de Defesa Aeroespacial Brasileiro
- DECEA: Departamento de Controle do Espaço Aéreo
- DGRS: Documento de Gerenciamento de Risco à Segurança Operacional
- EVLOS: Linha de Visada Visual Estendida
- ENLACE DE PILOTAGEM: Enlace entre a Aeronave Remotamente Pilotada e a Estação de Pilotagem Remota para a condução do voo.
- FPV: First Person View
- IFR: Regras de Voo por Instrumentos
- IMC: Condições Meteorológicas de Voo por Instrumentos
- NOTA: Notice to Airmen
- OACI: Organização de Aviação Civil Internacional
- RLOS: Linha de Visada Rádio
- RNAV: Navegação de Área
- RNP: Desempenho de Navegação Requerida
- RPA: Aeronave Remotamente Pilotada
- RPAS: Sistema de Aeronave Remotamente Pilotada

- RPS: Estação de Pilotagem Remota
- RVSM: Separação Vertical Mínima Reduzida
- SARP: Standards and Recommended Practices
- SDOP: Subdepartamento de Operações do DECEA
- SISCEAB: Sistema de Controle do Espaço Aéreo Brasileiro
- SISDABRA: Sistema de Defesa Aeroespacial Brasileiro
- SGSO: Sistema de Gerenciamento da Segurança Operacional
- SRPV-SP: Serviço Regional de Proteção ao Voo de São Paulo
- UAS: Sistema de Aeronave Não Tripulada
- UASSG: Grupo de Estudos sobre Sistemas de Aeronaves Não Tripuladas
- VANT: Veículo Aéreo Não Tripulado
- VFR: Regras de Voo Visual
- VMC: Condições Meteorológicas de Voo Visual
- VLOS: Linha de Visada Visual

- Notificações públicas

Antes de cada uma das campanhas, o Coordenador de Voo da equipe solicitará ao DECEA uma autorização para todos os voos previstos na Campanha. Além de estar de acordo com todas as regras e/ou diretrizes do DECEA é necessário também conhecer se existe alguma intenção de voar com o RPA próximo ou em espaço aéreo controlado ou restrito.

- Considerações estratégicas

Para a definição dos locais selecionados para o voo foram consideradas as seguintes características: o local de decolagem/aterrissagem é seguro durante a operação; o local da operação permite a identificação visual clara e contínua do RPA pelo operado ou piloto auxiliar em todos os momentos, com o auxílio de binóculos; a posição da equipe está em local com segurança, longe de aeroportos, em área livre, com local de pouso alternativo.

- Considerações climáticas e operação de emergência

As características dos equipamentos utilizados durante a operação serão sempre avaliadas antes do planejamento da campanha. Assim como uma análise aprofundada das previsões de vento, precipitação, nebulosidade, temperatura e possíveis entradas de frentes durante o período de execução dos voos. O uso de EPI e EPC é essencial para suportar as condições climáticas. Um

plano de emergência será sempre discutido antes do início das atividades de campo. Todos os procedimentos de emergência serão comunicados aos operadores, observadores e qualquer equipe de suporte adicional. Sempre haverá um kit de primeiros socorros disponível e os postos de saúde e hospitais mais próximos são conhecidos.

- Plano de operação / briefing

Um plano de voo específico para operação será discutido antes de cada campanha pela equipe de Coordenadores: de Equipamentos e Logística; de Megafauna; e de Voo. O Responsável Geral deverá aprovar a operação proposta, e toda a equipe de campo tomará conhecimento do planejamento.

- Inspeção de equipamentos – pré-voo

A inspeção dos equipamentos de voo deverá ser realizada antes de cada decolagem, conforme o Quadro 20.

Quadro 20. Inspeção de equipamentos e checklist utilizado antes da decolagem do RPA.

| FICHA DE VOO – 01 | | PRÉ-VOO CHECKLIST | |
|---|---------------------|--|--------------|
| Piloto em comando: | | Reg. DECEA N°: | Data: |
| Piloto auxiliar: | | Localização do serviço: | |
| Modelo RPA: | | Número da autorização de voo: | |
| Finalidade do Voo: | | | |
| Autorização de voo em espaço aéreo restrito: | | | |
| Autorizado por: _____ | | Título: _____ | |
| PRÉ-VOO: | | | |
| No. | Item | Condições Aceitáveis | Check |
| 1 | Espaço aéreo | Espaço aéreo solicitado e autorizado | |
| | | Possíveis obstruções próximas da trajetória de voo pretendida | |
| 2 | Velocidade do vento | Contando com rajadas não deve ser superior a 30km/h | |
| 3 | Precipitação | Não se deve decolar com precipitação e deve se observar as janelas de estiagem | |
| 4 | Luz | Observar a quantidade de luz disponível e se é preciso utilizar filtros ND | |
| 5 | Visibilidade | Verificar se há situações climáticas que dificultem a visibilidade ou então queimadas que podem interferir no resultado da coleta de dados | |
| 6 | Estrutura do RPA | Existe algum defeito estrutural visível | |

| No. | Item | Condições Aceitáveis | Check |
|----------------------------|---------------------------|--|-------|
| 7 | Hélices instaladas | As hélices estão instaladas corretamente | |
| 8 | Suportes | Verificação das ferragens e parafusos | |
| 9 | Bateria do RPA | Suficiente para o voo pretendido, não menos que 95% | |
| 10 | Bateria do controle | Suficiente para o voo pretendido, não menos que 95% | |
| 11 | Cartão de memória | Volume de memória suficiente para execução do serviço | |
| 12 | Observador | Presente, informado e pronto | |
| 13 | Trava de Câmera | Removida | |
| 14 | Gimbal | Testar o funcionamento em todas as direções | |
| 15 | Bateria do tablet/celular | Suficiente para o voo pretendido, não menos que 95% | |
| 16 | DJI GO | Aberto e rodando para verificar as condições e telemetria | |
| 17 | Calibração da bússola | Efetuada ou não solicitado | |
| 18 | Calibração do IMU | Efetuada ou não solicitado | |
| 19 | Calibração dos sensores | Efetuada ou não solicitado | |
| 19 | Câmera | Configura, fotografar e filmar | |
| 20 | Filtro ND | Analisar a luminosidade e a necessidade do uso de filtro ND | |
| 21 | GNSS | Fixado o ponto de Return to home | |
| 22 | Luzes indicativas | Piscando verde | |
| 23 | Altitude de retorno | Return to home 10m acima do plano de voo | |
| 24 | Modo de voo | A chave de modo de controle deve estar em Position | |
| 25 | Local de decolagem | Ao local deve ter aberto ao menos 10m de raio sem obstáculos | |
| 26 | Lithi | Planejamento de voo ativo | |
| LIGANDO OS MOTORES: | | | |
| No. | Item | Condições Aceitáveis | Check |
| 1 | Start dos motores | Os motores foram iniciados e estão funcionando | |

| | | corretamente e sem ruído | |
|-------------------------|--------------------|--|-------|
| No. | Item | Condições Aceitáveis | Check |
| 2 | Home Point | O home point foi fixado | |
| 3 | Voo de verificação | Levantar voo com altitude máxima de 10 pés | |
| 4 | Telemetria de voo | É verificável as condições de telemetria (Bat., Alt., Dist.) | |
| OPERAÇÃO DE VOO: | | | |
| Notas: | | | |

- Inspeção de equipamentos – pós-voo

A inspeção dos equipamentos de voo deverá ser realizada após cada aterrissagem, conforme o Quadro 21. Não desligue o transmissor enquanto a aeronave estiver ligada. Quando a aeronave for desligada, remova o cartão de memória (quando necessária) e a bateria.

Quadro 21. Inspeção de equipamentos e checklist de voo para pouso.

| FICHA DE VOO – 02 | | PÓS-VOO CHECKLIST | |
|---------------------------|----------------------------------|--|-------|
| Piloto em comando: | | Reg. DECEA N°: | Data: |
| PARA O POUSO: | | | |
| No. | Item | Condições Aceitáveis | Check |
| 1 | Local de Pouso | O local deve ser aberto ao menos 10m de raios sem obstáculos | |
| APÓS O POUSO: | | | |
| No. | Item | Condições Aceitáveis | Check |
| 1 | Baterias do RPA | Desligar | |
| 2 | Baterias do RC | Desligar | |
| 3 | Display | Desligar | |
| 4 | Trava do <i>Gimbal</i> e Câmeras | Instalar | |
| 5 | Cartão de Memória | Remover o cartão; guardar em local apropriado e já em um adaptador; recolocar outro cartão caso seja iniciado um novo projeto. | |
| OPERAÇÃO DE POUSO: | | | |

Notas:

❖ Aquisição de imagens e vídeos

As campanhas de coletas de imagens e filmes deverão ser realizadas durante voo não tripulado através de transectos na região da foz do rio Doce, com rotas já previstas de forma a abranger a maior área possível, a depender das autorizações de voo. Nos transectos pré-definidos, serão realizadas réplicas para análises estatísticas.

Antes de iniciar o voo, a câmera de vídeo será ajustada, com correção do modo de compensação de exposição à luminosidade e será realizado teste de gravação. As imagens serão gravadas em cartões de memória de 128 GB ou 64 GB. Após o voo, assim que o Drone aterrissar será feita a troca da bateria e do cartão de memória, quando necessário. O número cartão gravado será identificado na ficha de campo e guardados em cases de plástico e em sacola resistente à água, depois será mantido guardado na mochila do responsável pelas imagens, visando à preservação e integridade do dispositivo.

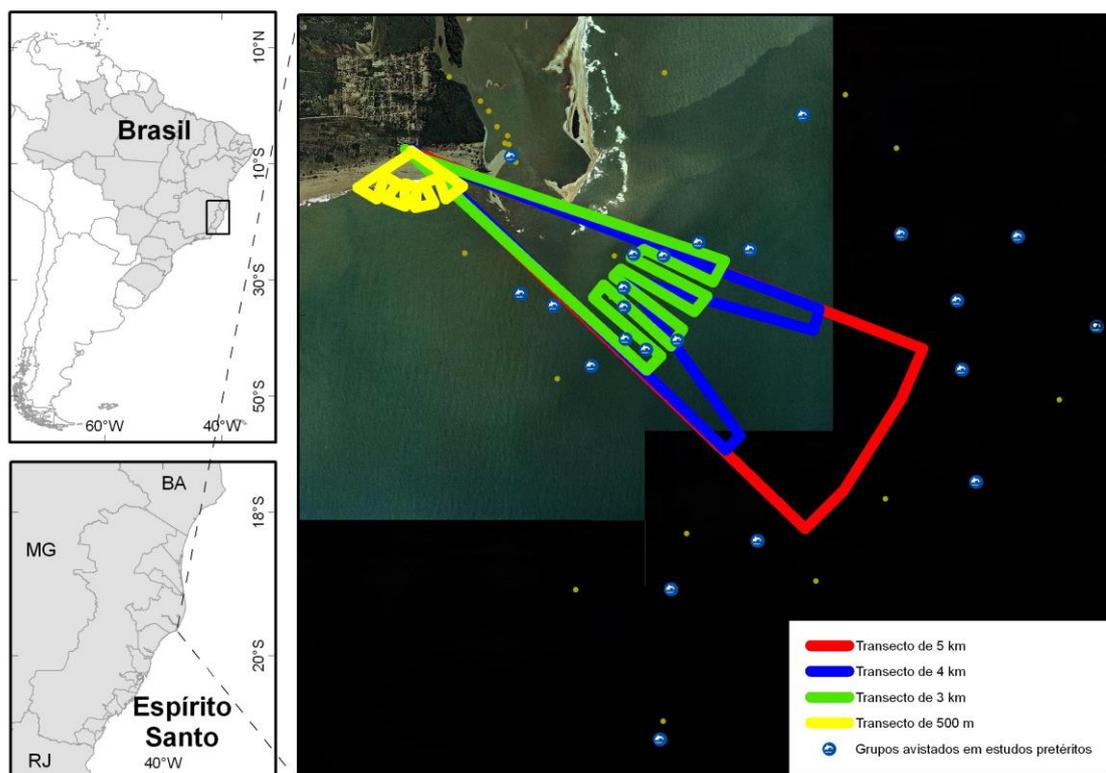
As baterias serão resfriadas em temperatura ambiente, para posterior recarregamento. Estes, quando necessário, ocorrerão durante atividade de campo. Deste modo, para cada voo será utilizado sempre uma bateria completa. Todos os cartões de memória estarão enumerados em etiqueta adesiva para controle de tráfego, assim como as baterias, incluindo as reservas. As baterias descarregadas estarão separadas e identificadas em adesivo branco, escrito em caneta permanente: "Sem Carga". As mesmas serão guardadas em um recipiente identificado para recarga. Para recarga na praia será utilizado um gerador de energia a gasolina na falta de uma fonte de energia disponível.

❖ Transectos

O início do transecto será sempre em ponto fixo. Foram estipulados até três (03) pontos de decolagem: dois ao sul, e um ao norte da foz do rio Doce. O mínimo de um ponto fixo será realizado sempre em frente à vila de Regência (19°39'13.05" S / 39°49'34.05" O). Havendo condições climáticas e logísticas durante a campanha mensal, será realizada a amostragem nas demais áreas. O segundo ponto fixo pré-definido ao sul do rio Doce é a base da REBio Comboios (19°40'20.23" S / 39°52'57.34" O). O terceiro ponto fixo de decolagem será em frente à Vila de Povoação (19°35'4.21"S / 39°47'1.17"O), localizada ao norte da foz do rio Doce. Cada ponto de decolagem será amostrado em um dia específico, dentro da mesma campanha amostral. Serão realizados transectos de 500m até 5000m de raio com área amostrada de 04 km² a 20 km², em cada um dos pontos. A varredura de cada transecto abrange de 50% a 100% da área amostrada.

O modelo de varredura proposto inicialmente terá duas rotas (missões) em cada ponto de partida: a primeira missão realizará transectos de forma a amostrar a totalidade da área com 500m de raio a partir da decolagem; a segunda missão realizará um transecto com 05 km de raio, e sobrevoará áreas com maiores profundidades (Figura 44). A execução da segunda missão dependerá das condições climáticas, de tempo e logística e, principalmente, da autorização do Departamento de Controle do Espaço Aéreo (DECEA), por tratar-se de um voo além da linha de visada visual (BVLOS). O início e o final das filmagens aéreas serão sempre o ponto fixo de partida. A direção da varredura dos transectos seguirá sempre o mesmo padrão: de Norte para Sul.

Figura 44. Modelos de transectos para monitoramento da megafauna na região da foz do rio Doce, através de sobrevoos não tripulados.



Esta área foi determinada levando em consideração as limitações de sinal dos Drones, e, principalmente, a duração das baterias dos mesmos. Cada transecto terá duração máxima de 20 min. O que permite uma margem de segurança de 11 min, levando em consideração a duração provável de 31 min das baterias dos Drones nas condições pré-estabelecidas.

Os transectos foram denominados levando em consideração os pontos de partida, a distância do voo, e a prioridade amostral. Desta forma, seguiremos a seguinte nomenclatura para identificação do Transecto específico:

- A1: Vila de Regência - Voo até 500m do ponto de decolagem;

- A2: Vila de Regência - Voo até 5000m do ponto de decolagem;
- B1: Base da REBio Comboios - Voo até 500m do ponto de decolagem;
- B2: Base da REBio Comboios - Voo até 5000m do ponto de decolagem;
- C1: Vila de Povoação - Voo até 500m do ponto de decolagem;
- C2: Vila de Povoação - Voo até 5000m do ponto de decolagem.

Serão levados três (03) Drones para cada campo de monitoramento da megafauna marinha na foz do rio Doce. Dois (02) Drones serão utilizados para a realização dos transectos, estes Drones foram denominados Transect, sendo utilizados de forma alternada em cada uma das réplicas realizadas no mesmo ponto. Quando possível, será utilizado um (01) Drone para monitorar o comportamento da Megafauna, especialmente dos Cetáceos que forem avistados durante a varredura dos Drones utilizados para Transectos. Por este motivo, este Drone foi denominado Behavior.

Para determinação das operações de voo, foi utilizada uma réplica de Toninha (*Pontoporia blainvillei*), pequeno Cetáceo encontrado na foz do rio Doce, com o objetivo de verificar as melhores características do monitoramento para atingir o objetivo de registro da megafauna (Figura 45). Os Drones Transect voarão entre 50 e 120m de altura em relação à superfície do mar, obedecendo a legislação pertinente. A varredura terá o alcance de 60 a 180m de largura, e as imagens serão captadas paralelamente a superfície (no Nadir). A velocidade de cruzeiro vai variar de 20 a 72 km/h. O transecto será realizado de forma contínua, sendo interrompido quando ocorrer avistagem. Para essa coleta de informação, os Drones Transect deverão ser pausados por um (01) minuto para determinação dos dados amostrais. Decorrido esse tempo o Drone deverá seguir realizando o transecto conforme missão previamente demandada.

No mesmo momento da observação da Megafauna, o Drone Behavior deverá ser enviado para o exato ponto que foi realizado a observação pelo Drone Transect. Esse ponto será determinado pelo rumo e distância entre o Drone e o ponto de partida. Assim que permitir a observação dos animais, o Drone Behavior deverá realizar a coleta de informações quanto ao comportamento do indivíduo ou grupo. Informações como, direção e velocidade de deslocamento, ritmo de mergulho, tamanho do grupo, número de neonatos, juvenis ou adultos, comportamentos de alimentação, deslocamento, interações intraespecíficas e interespecíficas, deverão ser registradas de 05 a 10min, a uma altitude entre 10 e 70m em relação ao objeto de estudo. Após o registro, este Drone deverá retornar ao ponto de apoio em terra.

As campanhas deverão ser realizadas mensalmente, em uma janela de oito (08) dias, com até seis (06) dias efetivos de amostragem. O esforço de coleta será realizado em um ponto de decolagem em cada dia. Cada área amostrada terá de seis (06) a dez (10) réplicas, e todas ocorrerão no mesmo dia. O esforço de campo não deverá ocorrer, ou será interrompido, quando a Escala Beaufort for igual ou superior a quatro (04), ou o vento na superfície for acima de 30 km/h.

Figura 45. Réplica de Toninha (P. blainvillei) utilizada para testes de visualização de megafauna em ambiente natural



❖ Aquisição de dados

Durante o monitoramento aéreo não tripulado, o Coordenador de Megafauna da campanha utilizará óculos de realidade virtual (Goggles DJI) para acompanhamento do voo. As informações deverão ser registradas em Caderno de Campo, seguindo as Ficha de Campo abaixo. A Ficha de Campo 01 deverá ser usada para o registro de dados durante operação de voo com o Drone Transect (Quadro 22), já a Ficha de Campo 02, deverá ser usada quando houverem voos realizados com o Drone Behavior (Quadro 23).

Quadro 22. Ficha de Campo para o registro de megafauna durante transecto realizado com o Drone Transect.

| FICHA DE CAMPO – 01 | | DRONE TRANSECT | | |
|-----------------------------|-------------|-----------------------|-------------|------------------|
| INFORMAÇÕES BÁSICAS | | | | |
| DATA: | | ALTITUDE DE VOO: | | |
| Nº VOO: | | VELOCIDADE DE VOO: | | |
| Nº TRANSECTO: | | BEAUFORT: | | |
| Nº RÉPLICA: | | VENTO DIREÇÃO: | | |
| HORA INÍCIO VOO: | | VENTO VELOCIDADE | | |
| HORA FINAL VOO: | | NEBULOSIDADE: | | |
| PILOTO: | | Nº DRONE: | | |
| COPILOTO: | | Nº BATERIA: | | |
| COORD. DE FAUNA: | | Nº CARTÃO: | | |
| OBSERVAÇÕES MEGAFUNA | | | | |
| TÁXON | HORA | BEHAVIOR (s/n) | RUMO | DISTÂNCIA |
| | | | | |
| | | | | |
| EXTRAS | | | | |

Quadro 23. Ficha de Campo para o registro do comportamento da megafauna durante voo realizado com o Drone Behavior.

| FICHA DE CAMPO – 02 | | DRONE BEHAVIOR | |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------|-----------|
| INFORMAÇÕES BÁSICAS | | | |
| DATA: | | ALTITUDE DE VOO: | |
| Nº VOO: | | VELOCIDADE DE VOO: | |
| Nº TRANSECTO: | | BEAUFORT: | |
| Nº RÉPLICA: | | VENTO DIREÇÃO: | |
| HORA INÍCIO VOO: | | VENTO VELOCIDADE | |
| HORA FINAL VOO: | | NEBULOSIDADE: | |
| PILOTO: | | Nº DRONE: | |
| COPILOTO: | | Nº BATERIA: | |
| COORD. DE FAUNA: | | Nº CARTÃO: | |
| OBSERVAÇÕES MEGAFUNA | | | |
| TÁXON / GRUPO | DESCRIÇÃO COMPORTAMENTO | | |
| | DESLOCAMENTO | ALIMENTAÇÃO | INTERAÇÃO |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| EXTRAS | | | |

❖ Arquivamento dos vídeos e dados dos voos

Para integração dos dados coletados, será utilizado um código identificador de cada voo, o qual contém a inicial do Drone utilizado, a data (ano + mês + dia) e o número do voo (ID_VOO), da mesma forma que a identificação dos vídeos realizados nesses voos (ID_VÍDEO). Cada vídeo tem um Log de voo, e este receberá o mesmo padrão de nomenclatura (ID_LOG). Também será utilizado um código identificador para cada grupo (ID_GRUPO), o qual contém a inicial do táxon (Aves, ou Mamíferos, ou Quelônios) e o tempo (minutos e segundos) do início da observação. Serão realizados frames dos vídeos para análise dos tamanhos dos indivíduos, ou fotoidentificação. Os cartões de memória com os vídeos serão descarregados diariamente no computador portátil e gravados em HD externo. Os locais de arquivamento das imagens, filmes e log de voos, deverão ser armazenados e nomeados sempre seguindo o seguinte padrão:

Locais de Arquivamento:

- HDs externos;
- Nuvens;
- Computador Portátil;
- Computador Base.
- Nomenclatura Pastas e Arquivos:
- Pasta principal: DRONE - MMF (Marine Megafauna);
- Subpastas;
- Ano 2018
- Ano 2019
- Nomenclatura Voos (ID_VOO):

INICIAL DO DRONE UTILIZADO + ANO + MÊS + DIA + N° DO VOO

- Exemplo: T_20181005_01
- T – Drone Transect
- 2018 – Ano da gravação
- 10 – Mês da gravação
- 05 – Dia da gravação
- 01 – Número sequencial e ininterrupto de voo durante do
- Nomenclatura Grupo (ID_GRUPO):

INICIAL DO TÁXON REGISTRADO + MINUTOS + SEGUNDOS (tempo do vídeo)

- Exemplo: Q_0235
- Q – Quelônio
- 02 – Dois minutos
- 35 – Trinta e cinco segundos

Arquivos Vídeos (ID_VÍDEO):

INICIAL DO DRONE UTILIZADO + ANO + MÊS + DIA + N° DO VOO

Exemplo: T_20181005_01.MOV

- T – Drone Transect
- 2018 – Ano da gravação
- 10 – Mês da gravação
- 05 – Dia da gravação
- 01 – Número sequencial e ininterrupto de voo durante o dia
- O formato do arquivo será: MOV ou MP4

Arquivos **Log** (ID_LOG):

INICIAL DO DRONE UTILIZADO + ANO + MÊS + DIA + N° DO VOO

- Exemplo: B_20190906_02.LOG
- B – Drone Behavior
- 2019 – Ano da gravação
- 09 – Mês da gravação
- 06 – Dia da gravação
- 02 – Número sequencial e ininterrupto de voo durante o dia
- O formato do arquivo será: LOG

Arquivos **Fotos** (ID_FOTO):

INICIAL DO DRONE UTILIZADO + ANO + MÊS + DIA + N° DO VOO + FOTO + N° DA FOTO

Exemplo: B_20190906_02_FOTO_02

- B – Drone Behavior

- 2019 – Ano da gravação
- 09 – Mês da gravação
- 06 – Dia da gravação
- 02 – N° sequencial e ininterrupto de voo durante o dia
- FOTO
- 01 – N° sequencial e ininterrupto durante o voo

O formato do arquivo será: JPEG

- Relatório de viagem

A equipe de campo será responsável pela geração de um Relatório de Viagem, seguindo modelo da RRDM, para reportar a conclusão das amostragens ou qualquer problema referente à coleta ou armazenamento das amostras.

Deverá ser realizado, pelo menos uma vez ao longo das campanhas de amostragem, o registro fotográfico da amostragem, sendo que uma cópia dos arquivos digitais com os procedimentos amostrais sucintamente descritos, com a data e autor da fotografia deverão ser encaminhados ao Escritório de Projetos, através do Relatório de Viagem. O objetivo do registro fotográfico é ilustrar o protocolo de amostragem, e material informativo e portal da RRDM para fins de difusão de informações.

- Comunicação

Eventuais problemas referentes ao desenvolvimento de embarque, procedimentos de segurança ou sobre questões técnicas deverão ser feitos ao coordenador de embarque da RRDM.

Os contatos com a equipe da RRDM em terra são:

Responsável Geral:

- Dr. João Batista Teixeira (27) 9 9239 5693 – jboceano@gmail.com / megafauna.ufes@gmail.com

Coordenador (a) de Megafauna:

- Me. Amanda Di Giacomo (27) 9 9792 3547 – amandagiacom@gmail.com
- Me. Jonathas Barreto (51) 9 9342 3461 – barreto.jonathas@gmail.com

Coordenador de Equipamentos e Logística:

- Biólogo Nelson Barcelos (27) 9 9869 7145 – nelsonbarcelos@gmail.com

Coordenador de Voo:

- Geógrafo Luciano Cajaíba (27) 9 8136 8883 – cajaiba@gmail.com

Escritório de Projetos

- Me. Patrícia Bourguignon Soares (27) 9 9975-4214 – patricia.copes@yahoo.com.br

5.6.2 Monitoramento acústico

A área a ser estudada corresponde ao entorno da foz do Rio Doce, abrangendo áreas marinhas costeiras e oceânicas adjacentes, incluindo as Unidades de Conservação: Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, REBIO Comboios, APA Costa das Algas e REVIS de Santa Cruz. O monitoramento acústico de cetáceos será conduzido a bordo de um veleiro seguindo método de amostragem por distância através de transecção linear (Buckland et al. 2001) em zig-zag. Os sinais acústicos serão coletados de forma contínua durante o período de amostragem através de uma matriz de arrasto. Simultaneamente será realizado o monitoramento visual com auxílio de binóculo reticulado ou olho nu. A cada avistagem o esforço sobre o transecto será interrompido para aproximação, durante a qual serão registradas as informações apresentadas no (Quadro 24.)

Quadro 24. Informações registradas durante a aproximação de grupo avistado.

| Informação | Método | Equipamento |
|-----------------------------|------------------------|--------------------|
| Espécie | Foto id. | Câmera Fotográfica |
| Estimativa tamanho de grupo | Visual | - |
| Coordenada geográfica | - | GPS |
| Profundidade* | - | Ecobatímetro |
| Estado do mar | Escala Beaufort/Visual | - |
| Registros acústicos** | - | Hidrofone estático |
| Comportamento** | Grupo focal | Filmadora |

* Devido a potencial influência do ecobatímetro nos sinais/emissões acústicas, a profundidade será o último parâmetro registrado, o que ocorrerá após o registro acústico e previamente à retomada do esforço sobre o transecto.

** Os equipamentos para registros acústico e comportamental serão sincronizados permitindo, assim, a associação potencial dos sinais acústicos registrados ao contexto comportamental exibido pelo grupo.

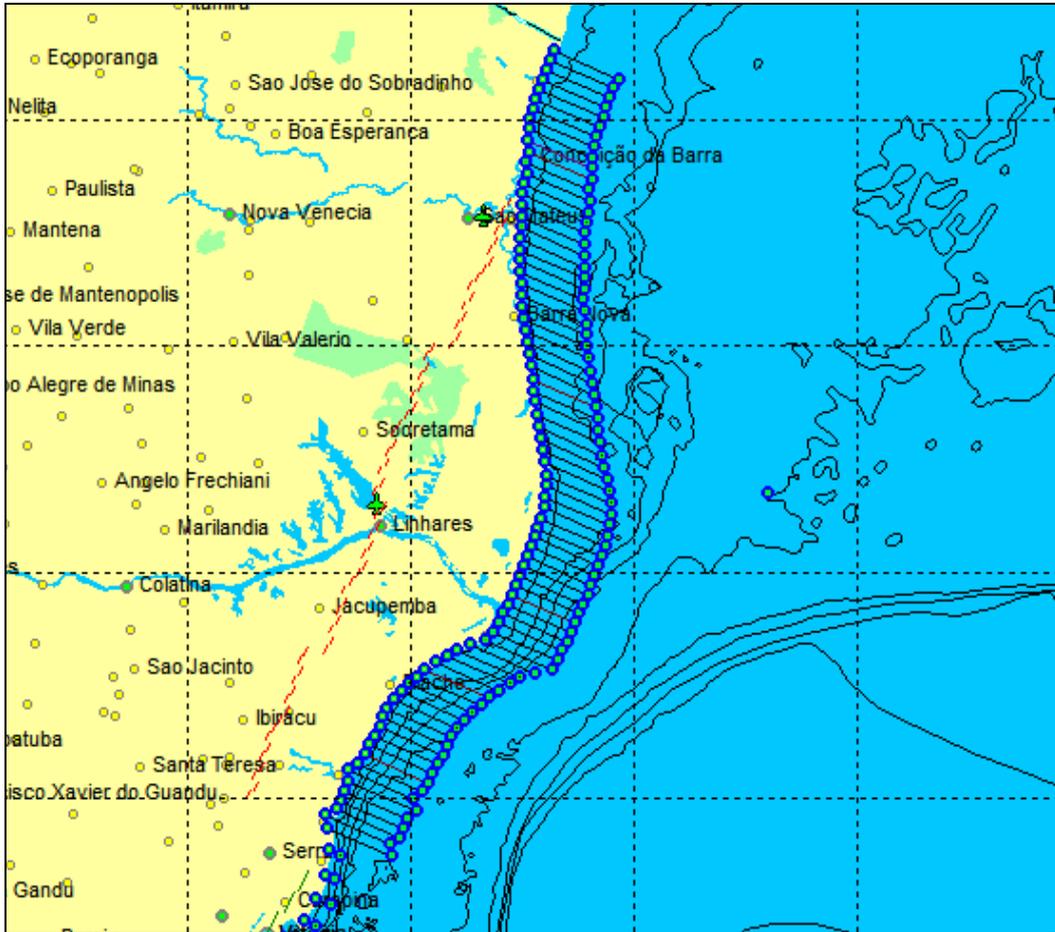
Os registros gravados serão armazenados em disco rígido em formato digital para posterior análise. Para cada arquivo uma duplicata será providenciada em disco rígido separado visando a segurança dos dados obtidos.

5.6.3 Monitoramento com veículos aéreos tripulados

Este protocolo descreve a logística operacional em campo que será realizada pela equipe do GEMARS durante a 1ª campanha do subprojeto “Monitoramento cetáceos a partir de técnicas de sobrevoos” a ser realizada entre os dias 15/01/2019 à 28/02/2019.

Esta campanha tem o foco principal realizar o monitoramento da toninha e outros pequenos cetáceos e será realizada na região litorânea entre o município de Vitória e Itaúnas, ES. A Figura 46 apresenta a área e 84 linhas de coleta de dados. As coordenadas geográficas de início (costa) e final (mar) de cada linha são apresentadas no (Quadro 25).

Figura 46. Mapa da área de estudo apresentando as 84 linhas que serão percorridas em esforço de observação pela equipe de pesquisa abordo da aeronave de trabalho.



Quadro 25. Lista de waypoints de início (costa) e final (mar) das 84 linhas de observação.

| Ponto | Referência | Lat | Long | Ponto | Referência | Lat | Long |
|-------|------------|----------|----------|-------|------------|----------|----------|
| 1 | costa | -20,3134 | -40,2802 | 43 | costa | -19,3501 | -39,6948 |
| 1 | mar | -20,326 | -40,2504 | 43 | mar | -19,4125 | -39,5526 |
| 2 | costa | -20,2744 | -40,2328 | 44 | costa | -19,327 | -39,6913 |
| 2 | mar | -20,286 | -40,2056 | 44 | mar | -19,3896 | -39,5486 |
| 3 | costa | -20,2252 | -40,2056 | 45 | costa | -19,3037 | -39,6873 |
| 3 | mar | -20,2399 | -40,1724 | 45 | mar | -19,3663 | -39,5437 |
| 4 | costa | -20,1744 | -40,1853 | 46 | costa | -19,2776 | -39,6896 |
| 4 | mar | -20,1848 | -40,1625 | 46 | mar | -19,3403 | -39,5469 |
| 5 | costa | -20,1187 | -40,1749 | 47 | costa | -19,2494 | -39,6956 |
| 5 | mar | -20,1295 | -40,1501 | 47 | mar | -19,3132 | -39,5514 |
| 6 | costa | -20,0522 | -40,1903 | 48 | costa | -19,2231 | -39,6998 |
| 6 | mar | -20,115 | -40,0473 | 48 | mar | -19,2862 | -39,5564 |
| 7 | costa | -20,0389 | -40,1635 | 49 | costa | -19,1972 | -39,7042 |
| 7 | mar | -20,1025 | -40,019 | 49 | mar | -19,2591 | -39,5627 |
| 8 | costa | -20,0166 | -40,1577 | 50 | costa | -19,1695 | -39,7098 |
| 8 | mar | -20,0789 | -40,0157 | 50 | mar | -19,2324 | -39,567 |
| 9 | costa | -19,9967 | -40,1482 | 51 | costa | -19,1431 | -39,7137 |
| 9 | mar | -20,0592 | -40,0055 | 51 | mar | -19,2057 | -39,5709 |
| 10 | costa | -19,9757 | -40,1386 | 52 | costa | -19,1164 | -39,7164 |
| 10 | mar | -20,0386 | -39,9971 | 52 | mar | -19,1793 | -39,5739 |
| 11 | costa | -19,947 | -40,1478 | 53 | costa | -19,0906 | -39,72 |
| 11 | mar | -20,0136 | -39,9963 | 53 | mar | -19,1533 | -39,5776 |
| 12 | costa | -19,9341 | -40,1203 | 54 | costa | -19,0644 | -39,7233 |
| 12 | mar | -19,9975 | -39,9767 | 54 | mar | -19,1272 | -39,5802 |
| 13 | costa | -19,9179 | -40,0991 | 55 | costa | -19,038 | -39,7274 |
| 13 | mar | -19,981 | -39,9561 | 55 | mar | -19,1006 | -39,5851 |
| 14 | costa | -19,8974 | -40,0899 | 56 | costa | -19,0112 | -39,7313 |
| 14 | mar | -19,9601 | -39,9474 | 56 | mar | -19,0736 | -39,5892 |
| 15 | costa | -19,876 | -40,0816 | 57 | costa | -18,9847 | -39,7358 |
| 15 | mar | -19,9386 | -39,9389 | 57 | mar | -19,0473 | -39,5932 |
| 16 | costa | -19,8574 | -40,0671 | 58 | costa | -18,9584 | -39,7395 |
| 16 | mar | -19,92 | -39,9241 | 58 | mar | -19,0213 | -39,5966 |
| 17 | costa | -19,8371 | -40,0579 | 59 | costa | -18,9312 | -39,7433 |
| 17 | mar | -19,8996 | -39,9154 | 59 | mar | -18,9942 | -39,6017 |
| 18 | costa | -19,8146 | -40,0526 | 60 | costa | -18,9063 | -39,7447 |
| 18 | mar | -19,8779 | -39,909 | 60 | mar | -18,9693 | -39,6017 |
| 19 | costa | -19,7957 | -40,0395 | 61 | costa | -18,8804 | -39,7455 |
| 19 | mar | -19,8578 | -39,8975 | 61 | mar | -18,9437 | -39,6022 |
| 20 | costa | -19,7779 | -40,0234 | 62 | costa | -18,8542 | -39,7486 |

| Ponto | Referência | Lat | Long | Ponto | Referência | Lat | Long |
|-------|------------|----------|----------|-------|------------|----------|----------|
| 20 | mar | -19,8405 | -39,881 | 62 | mar | -18,9167 | -39,6066 |
| 21 | costa | -19,7607 | -40,0065 | 63 | costa | -18,8288 | -39,7503 |
| 21 | mar | -19,8238 | -39,8636 | 63 | mar | -18,8915 | -39,6075 |
| 22 | costa | -19,7437 | -39,9873 | 64 | costa | -18,8046 | -39,7481 |
| 22 | mar | -19,8063 | -39,8454 | 64 | mar | -18,8679 | -39,6053 |
| 23 | costa | -19,7267 | -39,97 | 65 | costa | -18,7807 | -39,7478 |
| 23 | mar | -19,7894 | -39,8281 | 65 | mar | -18,8431 | -39,6053 |
| 24 | costa | -19,7111 | -39,9488 | 66 | costa | -18,7558 | -39,7471 |
| 24 | mar | -19,774 | -39,8058 | 66 | mar | -18,8188 | -39,6041 |
| 25 | costa | -19,6969 | -39,9259 | 67 | costa | -18,7317 | -39,7459 |
| 25 | mar | -19,7597 | -39,7849 | 67 | mar | -18,7942 | -39,6032 |
| 26 | costa | -19,6826 | -39,9009 | 68 | costa | -18,7066 | -39,7458 |
| 26 | mar | -19,7449 | -39,7601 | 68 | mar | -18,7694 | -39,6034 |
| 27 | costa | -19,6692 | -39,875 | 69 | costa | -18,6818 | -39,7451 |
| 27 | mar | -19,7307 | -39,7349 | 69 | mar | -18,7443 | -39,6024 |
| 28 | costa | -19,6576 | -39,8443 | 70 | costa | -18,6579 | -39,7419 |
| 28 | mar | -19,7213 | -39,7002 | 70 | mar | -18,7213 | -39,5988 |
| 29 | costa | -19,6419 | -39,8233 | 71 | costa | -18,6356 | -39,7369 |
| 29 | mar | -19,7073 | -39,6729 | 71 | mar | -18,6981 | -39,5941 |
| 30 | costa | -19,6254 | -39,8036 | 72 | costa | -18,6129 | -39,7311 |
| 30 | mar | -19,6885 | -39,6602 | 72 | mar | -18,676 | -39,5879 |
| 31 | costa | -19,6059 | -39,792 | 73 | costa | -18,5897 | -39,7293 |
| 31 | mar | -19,6683 | -39,6492 | 73 | mar | -18,6517 | -39,5884 |
| 32 | costa | -19,5852 | -39,782 | 74 | costa | -18,5638 | -39,7302 |
| 32 | mar | -19,6479 | -39,6397 | 74 | mar | -18,6267 | -39,5882 |
| 33 | costa | -19,565 | -39,7726 | 75 | costa | -18,5394 | -39,7303 |
| 33 | mar | -19,6278 | -39,63 | 75 | mar | -18,6015 | -39,5882 |
| 34 | costa | -19,544 | -39,7638 | 76 | costa | -18,5156 | -39,7278 |
| 34 | mar | -19,6065 | -39,6217 | 76 | mar | -18,5786 | -39,5845 |
| 35 | costa | -19,5227 | -39,7556 | 77 | costa | -18,4923 | -39,7233 |
| 35 | mar | -19,5852 | -39,6133 | 77 | mar | -18,555 | -39,5806 |
| 36 | costa | -19,5024 | -39,7452 | 78 | costa | -18,4699 | -39,7171 |
| 36 | mar | -19,5649 | -39,6033 | 78 | mar | -18,5328 | -39,5742 |
| 37 | costa | -19,481 | -39,736 | 79 | costa | -18,4485 | -39,7099 |
| 37 | mar | -19,544 | -39,5931 | 79 | mar | -18,5111 | -39,5671 |
| 38 | costa | -19,4595 | -39,7279 | 80 | costa | -18,4267 | -39,7026 |
| 38 | mar | -19,5223 | -39,5858 | 80 | mar | -18,4896 | -39,5595 |
| 39 | costa | -19,4379 | -39,7208 | 81 | costa | -18,4057 | -39,6946 |
| 39 | mar | -19,5002 | -39,5782 | 81 | mar | -18,4686 | -39,552 |
| 40 | costa | -19,4164 | -39,713 | 82 | costa | -18,3841 | -39,6873 |
| 40 | mar | -19,4792 | -39,5699 | 82 | mar | -18,4467 | -39,5443 |

| Ponto | Referência | Lat | Long | Ponto | Referência | Lat | Long |
|-------|------------|----------|----------|-------|------------|----------|----------|
| 41 | costa | -19,3959 | -39,7048 | 83 | costa | -18,3638 | -39,6772 |
| 41 | mar | -19,458 | -39,5613 | 83 | mar | -18,4263 | -39,5346 |
| 42 | costa | -19,3736 | -39,6981 | 84 | costa | -18,3436 | -39,6668 |
| 42 | mar | -19,4359 | -39,5553 | 84 | mar | -18,4061 | -39,5238 |

Os dados referentes aos integrantes da equipe de campo e o período de atuação na 1ª campanha encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Lista de pesquisadores que participarão do trabalho de campo.

| Nome | Função | RG | Telefone de contato | Contato de emergência | Instituição de Origem | Período de atuação na campanha | Origem |
|----------------------------|-------------------------|-------------|---------------------|--|-----------------------|--------------------------------|--------------------|
| Daniel Danilewicz Schiavon | Pesquisador Coordenador | 4056980784 | (51) 995627267 | Larissa Heinzelmann (companheira) (51) 985696997 | GEMARS | 15/01/2019 à 28/02/2019 | Torres, RS |
| Federico Sucunza Perez | Pesquisador | 9078633221 | (51) 991006015 | Marta Sucunza (tia) (51) 9216 0754 | GEMARS | 15/01/2019 à 28/02/2019 | Torres, RS |
| Paulo Henrique Ott | Pesquisador | 1044143061 | (51) 999731795 | Eduardo Ott (irmão) (51) 999640569 | GEMARS | 15/01/2019 à 28/02/2019 | Torres, RS |
| Martin Sucunza Perez | Pesquisador | 7078625733 | (51) 992760267 | Marta Sucunza (tia) (51) 9216 0754 | GEMARS | 15/01/2019 à 28/02/2019 | Torres, RS |
| Mariana Neves Capello | Pesquisador | 27678087802 | (21) 996092724 | Rodrigo Leão de Moura (marido) (21) 996092724 | GEMARS | 15/01/2019 à 28/02/2019 | Rio de Janeiro, RJ |
| Natalia Bragiola Berchieri | Pesquisador | 3124914437 | (51) 999015776 | Theresa Cristina Bragiola (mãe) (016) 981967646 | GEMARS | 15/01/2019 à 28/02/2019 | Torres, RS |

A aeronave utilizada nos levantamentos aéreos é um Aerocommander 500b (PT-KUK ou PT-ICR) (Figura 47), aeronave de asa fixa, bimotor, com janelas-bolhas para observação, e, devidamente equipada com todos os equipamentos de segurança (balsa salva-vidas, Epirb: localizador via satélite, sinalizadores e telefone satelital), e homologado pela Agência Nacional de Aviação Civil (ANAC) para monitoramentos sobre o mar.

Figura 47: Aeronave que será utilizada nos trabalhos de campo.



O monitoramento aéreo para pequenos cetáceos e tartarugas deverá ser realizado durante 45 dias. Serão percorridas 84 linhas (com réplicas) entre Vitória e Itaúnas, ES. É importante notar que o registro e contagem de cetáceos e tartarugas a partir de aeronave é muito sensível ao estado do mar, devendo ser realizado apenas em condições meteorológicas (vento e chuva) apropriadas a fim de minimizar a perda de animais pelos observadores. Neste sentido, parte dos dias alocados para o trabalho de campo deverá ser de espera em terra por condições meteorológicas favoráveis pela equipe de observadores. Os voos partirão do aeroporto Eurico Salles em Vitória, onde a aeronave ficará alocada. Esporadicamente, os aeroportos de São Mateus e Linhares, ES, poderão ser utilizados como pontos de abastecimento.

Para dúvidas e esclarecimentos, contatar o coordenador do subprojeto e responsável pela campanha, Dr. Daniel Danilewicz (E.mail: daniel.danilewicz@gmail.com; Tel: (51) 995-627267).

5.6.4 Monitoramento de aves marinhas

As aves marinhas formam um grupo cosmopolita dentro da Classe Aves, o qual depende da heterogeneidade da paisagem marinha para sua sobrevivência e manutenção da biodiversidade. O espaço e os recursos marinhos são partilhados entre espécies reproduzindo-se e/ou alimentando-se em um mesmo sítio, de modo que a persistência das populações depende do equilíbrio dinâmico desses ambientes. Mudanças abruptas na paisagem ecológica da área de vida das aves marinhas representam não apenas uma ameaça às populações de aves, mas também um desequilíbrio crítico no ambiente como um todo, visto que esse grupo desempenha importantes serviços ecossistêmicos.

A potencial alteração do ambiente marinho na Foz do Rio Doce e adjacências, causada pela disposição de rejeitos de minério de ferro, ameaça as espécies de aves marinhas que, reconhecidamente, dependem do ambiente costeiro, como *Sula leucogaster*, e reforçam o alerta de conservação das espécies já oficialmente ameaçadas de extinção e que ocorrem na região, como *Phaethon aethereus*, *Pterodroma arminjoniana*, *Thalassarche chlororhynchos* e *Sterna hirundinacea*. Desse modo, é fundamental dimensionar o impacto do desastre ambiental ocorrido no Rio Doce sobre as aves marinhas, bem como monitorar as espécies que ocorrem na região para avaliar os efeitos da descaracterização do ambiente em curto, médio e longo prazos.

❖ Captura de aves vivas e acesso às carcaças

As aves vivas deverão ser capturadas para fixação de equipamentos de rastreamento remoto, marcação individual, e coleta de material biológico. Nas áreas reprodutivas, as aves serão capturadas em seus ninhos manualmente ou com auxílio de puçá. No mar, as aves serão capturadas com auxílio de tarrafa quando a ave se aproximar da embarcação, seguindo Bugoni et al. (2008). Além disso, serão obtidas amostras de carcaças das espécies-alvo encontradas na praia. As aves serão acessadas após comunicação da equipe por parte do Programa de Monitoramento de Praia.

❖ Rastreamento remoto em período reprodutivo

Para a definição das zonas de forrageamento e comportamento de alimentação das aves de Abrolhos (*S. leucogaster* e *P. aethereus*) durante o período reprodutivo, serão utilizados equipamentos registradores de posição satelital com frequência de amostragem de 1 posição a cada 10 segundos e acelerômetros tri-axiais de aceleração estática e dinâmica com frequência de amostragem de até 100 Hz. Inicialmente, os ninhos das espécies serão numerados com fitas coloridas como forma de facilitar a localização noturna dos ninhos e organização do desenho amostral. As aves serão capturadas à noite quando estão descansando no ninho, manualmente ou com auxílio de varas equipadas com rede ou laço, dependendo da necessidade de cada caso. Os equipamentos de GPS (após impermeabilizados com tubos termocontráteis) e acelerômetros (os quais já vêm impermeabilizados de fábrica, com resina tipo epóxi) serão acoplados nas quatro penas centrais da cauda dos adultos utilizando fita especial da marca TESA, modelo 4651. Os adultos selecionados terão ninhegos de aproximadamente um mês de idade, os quais são caracterizados pela ausência de rêmiges e retrizes e corpo coberto apenas por plumas (Nelson 2005). Os equipamentos (mais fita adesiva e anilha) terão cerca de 15g, o que corresponde a menos de 3% da massa corporal das aves estudadas. Após o processo de fixação do aparelho, o qual dura aproximadamente 5 minutos, a ave será solta no ninho onde foi capturada. A recaptura para recuperação dos aparelhos será feita na noite seguinte, através do mesmo procedimento referido acima, quando a ave retornar da viagem de alimentação diurna e estiver novamente descansando no ninho. Os instrumentos colocados nas aves podem ser facilmente recuperados e reutilizados, logo após a transferência dos dados para um computador portátil e recarregamento da

bateria. Serão coletados dados de rastreamento para cada uma das espécies, considerando como satisfatório um mínimo de duas viagens de alimentação para cada indivíduo.

❖ Rastreamento remoto em período não reprodutivo

As aves marinhas serão rastreadas em período não reprodutivo através de geolocalizadores e GPS-PTT's (do inglês Platform Transmitter Terminal). Geolocalizadores são equipamentos de pequeno porte que registram a intensidade de luz em intervalos curtos de tempo e possibilitam o cálculo de duas posições diárias (latitude e longitude) aproximadas, por longos períodos. Para determinação das áreas de invernagem de *Sula leucogaster*, *Phaethon aethereus*, e *Pterodroma arminjoniana* serão colocados geolocalizadores com sensores de temperatura e wet/dry, os quais têm capacidade para registro de dados a cada 5 minutos, durante 2 anos, e possuem massa de 1,5 g, ou seja, abaixo dos 3% da massa corporal das aves. As aves serão capturadas no ninho, manualmente, e o equipamento será aderido à anilha com lacre plástico. Após a fixação do aparelho, processo que dura cerca de cinco minutos, a ave será solta onde foi capturada. Quando do retorno das aves no ano seguinte ao de sua marcação, a ave será recapturada no ninho, o equipamento será removido, e os dados descarregados em computador. O equipamento registra ainda imersão na água (sensor úmido/seco), permitindo inferir períodos de voo e de mergulho ou pouso na água, bem como temperatura superficial da água.

Para determinação das áreas de invernagem de *Thalassarche chlororhynchos* serão utilizados GPS-PTT's, cujos transmissores por satélite deverão emitir sinais de rádio captados pelos satélites em órbita terrestre que estão sobre a área no momento em que o sinal é emitido. Os equipamentos serão fixados no dorso das aves marinhas e recarregados através de um painel solar. Os dados deverão ser obtidos sem a necessidade de recaptura dos organismos, através de um canal de transmissão de dados alugado junto a empresas como a ARGOS. Para fixação dos equipamentos, as aves serão capturadas no mar, durante os censos embarcados realizados pelo Projeto Albatroz. Com a ave contida, o rastreador será fixado nas penas de contorno do dorso com Fita TESA 4651. Após o procedimento, que dura cerca de cinco minutos, a ave será liberada no mar e os dados de rastreamento são enviados remotamente ao pesquisador.

❖ Censos embarcados

A metodologia para contagem das aves marinhas deverá ser a de censo contínuo e instantâneo utilizando embarcação (Tasker et al., 1984), pois oferece as melhores estimativas de densidade relativa e absoluta das aves encontradas no mar (voando ou pousadas). Esse método pode fornecer uma estimativa valiosa da abundância de aves marinhas que forrageiam em uma determinada área ou estão associadas a colônias próximas. Ao longo de vários anos de estudo, esse método deve fornecer uma medida de circunstâncias dos locais de alimentação, bem como de variações no uso destes locais. A distribuição e abundância das aves marinhas deverão ser obtidas através de censos embarcados mensais. As aves marinhas deverão ser identificadas através de guias específicos (Harrison, 1985; Onley e Scofield, 2007) e contadas através de censos contínuos e

instantâneos segundo Tasker et al. (1984) e Gould e Forsell (1989), incluindo as aves seguidoras. Serão realizadas 7 transecções com 200 km de extensão (2 ao sul, 4 ao norte e 1 na foz) e deverão ser percorridos durante o deslocamento da embarcação, preferencialmente, em linha reta na área monitorada, ao longo das horas de luz do dia. Cada estação de contagem deverá incluir as seguintes atividades em ordem de execução: (1) contagem de aves seguidoras na popa da embarcação; (2) tomada de informações sobre variáveis espaciais, temporais e ambientais (data, hora, latitude e longitude, rumo e velocidade da embarcação, profundidade, tipo de atividade desenvolvida pelo barco, estado do mar conforme escala Beaufort, temperatura e salinidade da água, temperatura do ar, direção e intensidade do vento); (3) censo contínuo; e (4) censo instantâneo. Os censos serão realizados por pelo menos um ornitólogo com experiência reconhecida, sempre do mesmo local, ou do melhor lado da embarcação de acordo com condições de luz e vento no momento. Ao final de uma sequência de censo, outra deverá ser iniciada após intervalo de 10 minutos. Aves seguidoras são aquelas que acompanham a embarcação durante a navegação, geralmente voando atrás do barco, e deverão ser contadas da popa. O censo contínuo deverá abranger as aves que durante um período fixo de tempo aparecem dentro de uma faixa de 300 m de largura, medida a partir do bordo da embarcação em ângulo reto com a rota do navio, excluindo as aves seguidoras. No censo instantâneo o tempo de contagem deverá ser dividido em intervalos consecutivos de duração fixa. Ao início de cada intervalo deverão ser contadas as aves presentes dentro do raio de 300 m entre o rumo do barco e a linha perpendicular a este, varrendo-se assim a quarta parte de um círculo. Os censos contínuos deverão ter duração de 10 minutos, e os censos instantâneos terão 10 intervalos consecutivos de 1 minuto. A posição do limite externo da faixa de censo deverá ser determinada segundo Heinemann (1981), através de uma triangulação envolvendo a largura da faixa de censo de 300 m, a altura do observador acima da superfície do mar e a distância entre os olhos do observador e a ponta superior de um paquímetro colocada na linha do horizonte. Para tal a embarcação deverá navegar a velocidade constante, com rumo conhecido, e que a linha do horizonte seja visível. Os censos deverão ser realizados por dois ornitólogos com experiência, simultaneamente para evitar problemas de detecção de aves durante o deslocamento da embarcação (Spear et al., 2004) e deverá ser auxiliado pelo observador de mamíferos. A densidade de aves (número de aves/km²) deverá ser calculada com base nos resultados obtidos nos censos instantâneos, com referência a área total coberta em cada censo, sendo esta igual a 10 vezes a área varrida em cada contagem instantânea.

❖ Censos de praia

A metodologia a ser executada deverá ser o "Itinerário Fixo", a ser percorrido por veículo motorizado, devendo ser estabelecido pelo menos quatro trilhas a serem percorridas mensalmente na praia. Cada trilha terá, no mínimo, 30 km. Duas devem seguir ao norte da foz (até o Degredo e Barra Seca), outra ao sul da foz (até Barra do Riacho) e uma última mais ao sul (15 km ao norte do Piraque-açu e 15 km ao sul). Também deve ser usado o método de "Contagem em Descanso", haja

vista existência de bancos de areia às margens da foz e no estuário, que são utilizados como dormitório e área de descanso pelas aves.

❖ Coleta de dados demográficos nas áreas reprodutivas

Para a estimativa do tamanho populacional, será realizada uma busca ativa de ninhos de *Phaethon aethereus* e *Sula leucogaster* em todo o arquipélago dos Abrolhos, e de *Pterodroma arminjoniana* em Trindade (Mancini et al. 2016), durante o pico reprodutivo de cada espécie. Durante o período reprodutivo de cada espécie, uma amostra da colônia será monitorada quinzenalmente da postura do ovo ao voo dos filhotes, para levantar dados sobre sucesso reprodutivo, sobrevivência, fidelidade ao ninho e ao parceiro reprodutivo. Em Abrolhos, os trabalhos de campo estarão em consonância com o Programa de monitoramento de aves marinhas do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (ICMBio 2017). Os ninhos serão identificados e georeferenciados, e adultos e filhotes serão individualizados com anilhas metálicas do CEMAVE/ICMBio.

❖ Coleta de amostras biológicas

- Parâmetros de saúde, variabilidade genética e toxicologia

Deverão ser obtidas amostras de sangue e suabes de todas as aves que forem manipuladas nas capturas a bordo, em Abrolhos, em Trindade e no monitoramento de encalhes nas praias. Neste último, considerando as espécies-alvo do monitoramento (*Sula leucogaster*, *Thalassarche cholorynchos*, *Phaethon aethereus*, *Sterna hirundinacea* e *Pterodroma arminjoniana*). As coletas de sangue deverão ser realizadas por venopunção da veia ulnar ou da jugular. No máximo 1% do peso corporal de sangue de cada ave deverá ser coletado, utilizando agulhas descartáveis acopladas em seringas heparinizadas. De cada indivíduo, 100 µl de sangue serão estocados em microtubos com álcool 70° ou álcool absoluto para posterior extração de DNA e análises moleculares para estimativas de índices de variabilidade genética. Essas amostras serão enviadas para análise no Instituto de Ciências Biológicas da FURG. As amostras destinadas aos parâmetros de saúde, após a coleta, serão mantidas em caixas refrigeradas para serem encaminhadas, sob refrigeração, a laboratórios comerciais e/ou parceiros da Rede Albatroz, criada no âmbito do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petréis – PLANACAP, pelo Projeto Albatroz. Das aves encontradas mortas durante os monitoramentos de praia, serão realizadas coletas de penas e músculo, prioritariamente. Este material deverá ser congelado para posterior análise.

As amostras de sangue total deverão ser processadas para realização dos parâmetros hematológicos e extração de DNA. Padrões hematológicos serão obtidos pelos profissionais de medicina veterinária em campo ou até 24-48 h após a colheita das amostras. As amostras de DNA extraídos por kits comerciais, tanto das amostras de sangue quanto das amostras de suabes cloacais e de orofaringe, deverão ser mantidas congeladas a -80°C para posterior utilização nos exames de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético para a identificação do patógeno. As amostras de cloaca e orofaringe para análise microbiológica e PCR deverão ser coletadas das aves utilizando-se suabes estéreis específicos e mantidas refrigeradas

em meio de transporte Stuart por até 48 h até processamento no laboratório (cultura e isolamento das bactérias para posterior extração de DNA e sequenciamento genético). Um segundo suabe de cloaca e orofaringe deverá ser processado diretamente para detecção molecular de patógenos, sendo mantido congelado em tubos tipo eppendorf contendo meio PBS, antibiótico e antifúngico, desde imediatamente após a colheita até análise laboratorial. Estas amostras também poderão ser utilizadas no sequenciamento em massa (metagenômica) para identificação da presença dos patógenos de escolha, notadamente bactérias.

- Análises isotópicas

Para a análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, serão coletadas amostras de 1 cm³ de músculo das aves mortas nas praias, 100 µl de sangue e penas das aves vivas, e 1 cm³ de músculo das potenciais presas das aves marinhas. As amostras de aves vivas serão obtidas por punção de veia tarsal, com auxílio de seringas e agulhas estéreis. As amostras de músculo de aves encontradas mortas nas praias serão coletadas com bisturis estéreis. As amostras de potenciais presas serão coletadas a partir do material regurgitado espontaneamente pelas aves, com auxílio de bisturis estéreis. Todas as amostras devem ser estocadas em microtubos e congeladas, sem adição de álcool. Todas as amostras devem ser enviadas para análise no Instituto de Ciências Biológicas da FURG.

5.6.5 Monitoramento de Cetáceos

- ❖ Monitoramento do uso do habitat por cetáceos em áreas adjacentes e da foz do Rio Doce a partir de avistagem por ponto fixo

O monitoramento de cetáceos através do método de avistagem por ponto fixo teve início na primeira semana de outubro de 2018, por 12 meses. Os quatro pontos de observação pré-determinados estão localizados em dois municípios distintos: Aracruz e Linhares (Figura 48 e Figura 49).

No município de Aracruz, a observação ocorrerá na foz do rio Piraqueaçu e na praia de Santa Cruz (Figura 48). Em Linhares, a observação será na foz do rio Rio Doce e na praia de Regência (Figura 49). É importante salientar que os pontos inicialmente definidos estão sujeitos a alterações após saída prévia para validação dos mesmos. Essa saída prévia ocorrerá na semana de 24 a 28/09/18.

Com a utilização de binóculos (BUSHNELL 10x42MM, com alcance de 12km), as observações serão realizadas por dois pesquisadores, sendo duas observações semanais para cada um dos pontos de cada cidade, e 5h diárias por ponto por observador. As observações serão realizadas entre 5:30 e 17:30, considerando a claridade natural do dia e condições climáticas favoráveis (escala Beaufort de 0 a 3). O período do dia de observação entre os pontos será alternado para evitar repetições de marés.

O método utilizado para as observações será a observação de grupo-focal com registro instantâneo do comportamento em intervalos de cinco minutos (Daura-Jorge et al. 2005; Azevedo et al. 2007). Quando forem avistados cetáceos serão registrados: espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento, localização exata (GPS), e outras informações apresentadas na planilha pré-formulada (Tabela 12).

Figura 48. Pontos fixos na foz do Rio Piraqueaçu (A) e praia de Santa Cruz (B), Aracruz – ES.

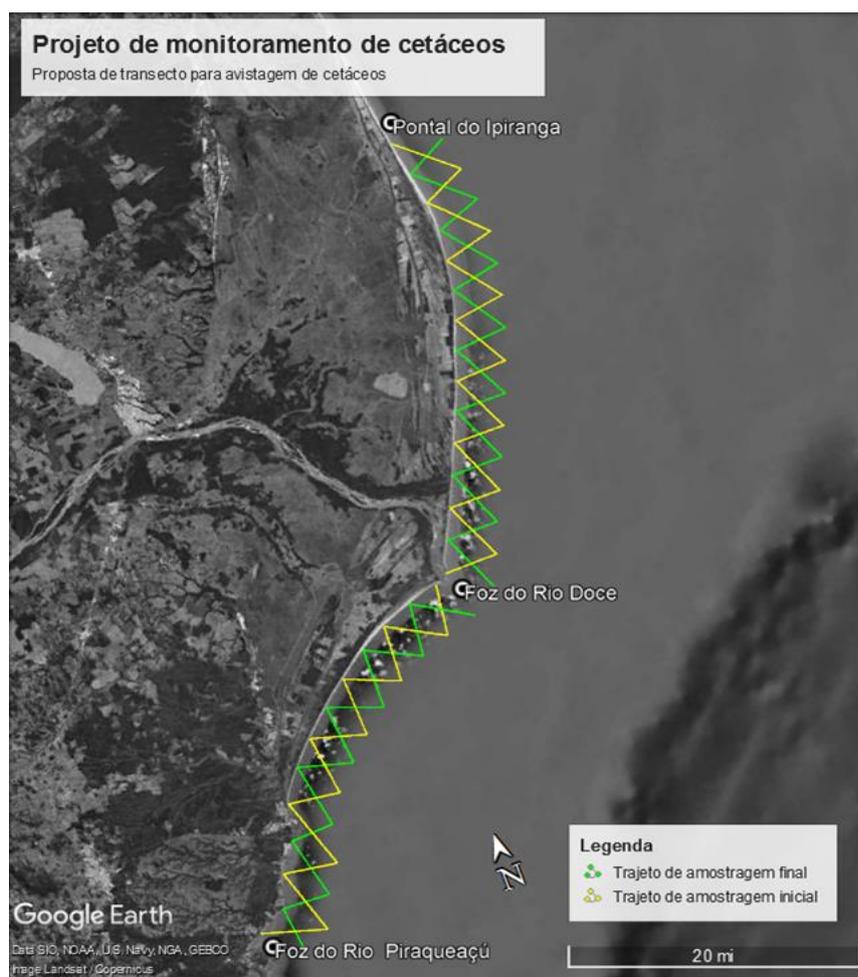


Figura 49. Pontos fixos na foz do Rio Doce (A) e praia de Regência (B), Linhares – ES.



O embarque será mensal, tendo como ponto de partida provavelmente o porto do rio Piraqueaçu, em Santa Cruz. A cada mês, de forma alternada, o monitoramento está previsto para abranger a região ao sul da foz do Rio Doce até o Rio Piraqueaçu e a região ao norte da foz do Rio Doce, até a região de Pontal do Ipiranga em Linhares, com previsão de 10 a 12 horas de duração. A embarcação utilizada atuará com velocidade de cruzeiro estimado entre 9 a 14 milhas/h. Baixas velocidades da embarcação oportunizam a detecção de cetáceos que estiverem parte do tempo indisponível, por estarem mergulhando, para amostragem por parte do observador, assim minimizando o viés de disponibilidade (MARSH & SINCLAIR, 1989).

Figura 50. Mapa da proposta de transectos para avistagem de cetáceos.



Dois pesquisadores permanecerão simultaneamente em estado de observação, localizados na proa e popa da embarcação, respectivamente. Outros observadores, sempre que disponíveis, se posicionarão no través da embarcação. A fim de evitar a fadiga e possíveis vícios de observação individuais, haverá um revezamento entre observadores e anotadores. Os observadores procurarão cetáceos a "olho nu" e utilizando binóculos de 10 x 42. Serão embarcados cinco ou seis membros da equipe.

Quando um grupo de baleias e/ou golfinhos for avistado, serão registrados dados como: espécie, número de indivíduos por grupo, tipo de comportamento desenvolvido no momento, localização exata (GPS), e outras informações já listadas nas fichas de campo pré-formuladas (Quadro 26, Quadro 27 e Quadro 28). Serão feitas tentativas de aproximação, mantendo uma distância de segurança de 50 metros proposto por Schneider (1999). Caso a aproximação seja inferior aos 50 metros, o motor será colocado em neutro ou mesmo desligado, para evitar comportamentos de repulsa. Mudanças de direção da embarcação, superiores a 45 graus, serão evitadas. A permanência com cada grupo será de, aproximadamente, no máximo 20 minutos. Se possível serão realizadas biópsias (pele e gordura) dos cetáceos para as análises genéticas e de contaminantes. Serão realizados alguns registros fotográficos e de vídeos durante as avistagens.

Quadro 26. Ficha de cruzeiro de pesquisa.

| | | |
|--------------|-----------|-------------|
| Cruzeiro nº: | Data: / / | Embarcação: |
|--------------|-----------|-------------|

Coordenador: _____
 Participantes: _____
 Rota: _____

| | |
|-------|--|
| MANHÃ | Amostragem: Início ___:___ até ___:___ (Total: ___ min.) Distância amostrada: ___ mn |
| | Latitude Inicial: _____ °S Latitude Final: _____ °S |
| | Longitude Inicial: _____ °W Longitude Final: _____ °W |

| | |
|-------|--|
| TARDE | Amostragem: Início ___:___ até ___:___ (Total: ___ min.) Distância amostrada: ___ mn |
| | Latitude Inicial: _____ °S Latitude Final: _____ °S |
| | Longitude Inicial: _____ °W Longitude Final: _____ °W |

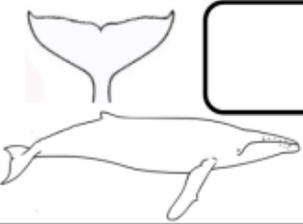
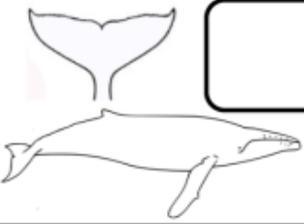
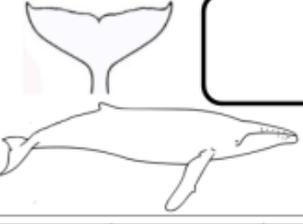
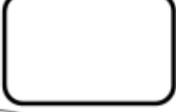
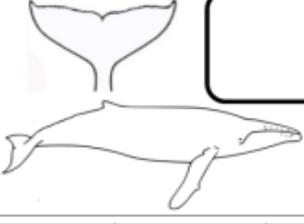
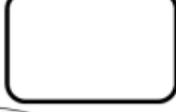
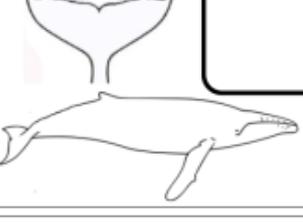
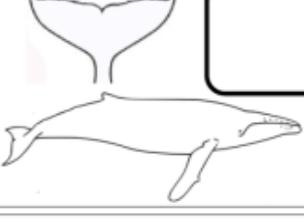
| | |
|---|-------------------------|
| Total em esforço de avistagem: _____ minutos | Fichas nº _____ a _____ |
| Distância Amostrada: _____ milhas náuticas | Nº de biópsias: _____ |
| Nº total de indivíduos: _____ | Nº de filhotes: _____ |
| Espécies avistadas/quantidade: () __Boto-Cinza () __ Toninha () __ Jubarte () __ outra: | |
| Observações: _____ _____ | |

| METEOROLOGIA | 1ª TOMADA | 2ª TOMADA | 3ª TOMADA | 4ª TOMADA | 5ª TOMADA | 6ª TOMADA |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| HORÁRIO | | | | | | |
| POSIÇÃO GEOGRÁFICA | Latitude | Latitude | Latitude | Latitude | Latitude | Latitude |
| | Longitude | Longitude | Longitude | Longitude | Longitude | Longitude |
| VISIBILIDADE | | | | | | |
| VENTO: VEL./ DIREÇÃO | | | | | | |
| MAR (Beaufort) | | | | | | |
| COBERTURA DO CÉU (%) | | | | | | |
| PROFUNDIDADE (pés) | | | | | | |
| TRANSPARÊNCIA (m) | | | | | | |
| Observações: _____ _____ | | | | | | |

Quadro 27. Ficha de observação de baleia jubarte.

| | | | | |
|---|--------------------|--------------------------|------------------|------------------------------------|
| Ficha nº: _____ | Cruzeiro nº: _____ | Data / / _____ | Nº Grupo: _____ | Registrador: _____ |
| Hora de início e término da avistagem: _____ às _____ | | (Total _____ minutos) | | |
| Horário de aproximação: _____ | | Profundidade: _____ | Fotógrafo: _____ | |
| Posição geográfica INICIAL: _____ °S | | FINAL: _____ °S | | |
| _____ °W | | _____ °W | | |
| Nº de indivíduos: _____ | | Composição social: _____ | | Grupo competitivo: () sim () não |
| | | | | Filhote: () sim () não |

| | | | |
|---|--|--|----------------------------------|
| Comportamentos observados: | <input type="checkbox"/> antes da aproximação | <input type="checkbox"/> após a aproximação | <input type="checkbox"/> filhote |
| <input type="checkbox"/> () () () repouso | <input type="checkbox"/> () () () espiar | <input type="checkbox"/> () () () salto _____ | |
| <input type="checkbox"/> () () () deslocamento | <input type="checkbox"/> () () () exp. ventral | <input type="checkbox"/> () () () exp. caudal em mergulho _____ | |
| <input type="checkbox"/> () () () exp. cauda parada | <input type="checkbox"/> () () () serpentear | <input type="checkbox"/> () () () batida de cauda _____ | |
| <input type="checkbox"/> () () () batida de cabeça | <input type="checkbox"/> () () () canto | <input type="checkbox"/> () () () batida de peitorais _____ | |
| <input type="checkbox"/> () () () emissão de ruído | <input type="checkbox"/> () () () merg. em desloc | <input type="checkbox"/> () () () salto/golpe de caudal _____ | |
| <input type="checkbox"/> () () () exalação de bolhas | | | |
| Observações: _____ | | | |

| Padrão: | Foto: | Zoom: | Distância: | Padrão: | Foto: | Zoom: | Distância: |
|-----------------|---|---|--------------------|-----------------|--|---|--------------------|
| ID OK: | | | Biópsia nº _____ | ID OK: | | | Biópsia nº _____ |
| Posição Social: |  |  | () pele em álcool | Posição Social: |  |  | () pele em álcool |
| | | | () gordura | | | | () gordura |
| | | | Reação: Sim () | | | | Reação: Sim () |
| | | | Não () | | | | Não () |
| | | | Qual: _____ | | | | Qual: _____ |
| | | | _____ | | | | _____ |
| | | | _____ | | | | _____ |
| ID OK: | | | Biópsia nº _____ | ID OK: | | | Biópsia nº _____ |
| Posição Social: |  |  | () pele em álcool | Posição Social: |  |  | () pele em álcool |
| | | | () gordura | | | | () gordura |
| | | | Reação: Sim () | | | | Reação: Sim () |
| | | | Não () | | | | Não () |
| | | | Qual: _____ | | | | Qual: _____ |
| | | | _____ | | | | _____ |
| | | | _____ | | | | _____ |
| ID OK: | | | Biópsia nº _____ | ID OK: | | | Biópsia nº _____ |
| Posição Social: |  |  | () pele em álcool | Posição Social: |  |  | () pele em álcool |
| | | | () gordura | | | | () gordura |
| | | | Reação: Sim () | | | | Reação: Sim () |
| | | | Não () | | | | Não () |
| | | | Qual: _____ | | | | Qual: _____ |
| | | | _____ | | | | _____ |
| | | | _____ | | | | _____ |

Para auxiliar na identificação das espécies, caso necessário, os observadores utilizarão guias de identificação e/ou registros fotográficos. Para um melhor resultado no monitoramento, será dada preferência para dias em que as condições marítimas estejam ao máximo de Beaufort 3 (ventos de 7-10 nós e ondulação de até 60 cm). Caso haja adversidades climáticas (baixa visibilidade e/ou chuvas persistentes) a amostragem poderá ser interrompida e transferida para outra data.

❖ Ecotoxicologia, Reprodução, Dieta, Genética, Histopatologia e Microbiologia

As análises serão realizadas em amostras coletadas de carcaças de cetáceos recolhidas nas praias da área monitorada. Os animais encalhados, normalmente são encontrados mortos. Amostras de biópsias de cetáceos poderão ser coletadas durante os cruzeiros do projeto.

A relação dos parâmetros a serem monitorados é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Relação dos parâmetros a serem analisados para cetáceos na área a ser monitorada.

| Amostra | Análise |
|----------------|---|
| Músculo | Mercúrio |
| - | Cádmio |
| - | Ferro |
| - | Cobre |
| - | Manganês |
| - | Zinco |
| - | Arsênio |
| - | Organoclorados |
| - | Organobromados |
| - | Isótopos estáveis de C e N |
| Fígado | Mercúrio |
| - | Cádmio |
| - | Ferro |
| - | Cobre |
| - | Manganês |
| - | Zinco |
| - | Arsênio |
| - | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| Rim | Mercúrio |
| - | Cádmio |
| - | Ferro |
| - | Cobre |
| - | Manganês |
| - | Zinco |
| - | Arsênio |
| Gordura | Organoclorados |

| Amostra | Análise |
|----------------|---|
| - | Organobromados |
| - | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| Gônadas | Estágio reprodutivo |

- Mercúrio e elementos-traço

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005).

As amostras de músculo (dorsal, lado esquerdo), fígado e rim (esquerdo) deverão ter aproximadamente 100g, dos quais 50g serão enviados à UERJ.

As amostras devem ser acondicionadas em saco zip sem etiqueta pelo lado de dentro, e armazenadas em freezer.

- Organoclorados e organobromados

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005).

As amostras de gordura deverão ter aproximadamente 100g, dos quais 50g serão enviados à UERJ.

As amostras devem ser acondicionadas em papel alumínio dentro de saco zip sem etiqueta pelo lado de dentro, e armazenadas em freezer.

- Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005).

As amostras de gordura deverão ter aproximadamente 100g, dos quais 50g serão enviados à UERJ.

As amostras devem ser acondicionadas em papel alumínio dentro de saco zip sem etiqueta pelo lado de dentro, e armazenadas em freezer.

- Isótopos estáveis

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005). As amostras de músculo deverão ter aproximadamente 20g.

As amostras devem ser acondicionadas em saco zip sem etiqueta pelo lado de dentro, e armazenadas em freezer.

- Análise reprodutiva

Deverão ser coletadas amostras de carcaças em códigos 2 e 3 (Geraci & Lounsbury 2005).

Coletar testículos e ovários (identificando direito e esquerdo) e fixar em formol 10%.

- Genética

Coletar pele ou músculo de carcaças em qualquer estado de conservação.

As amostras deverão ter tamanho aproximado de um grão de feijão. Idealmente, coletar duas amostras de cada animal e colocar em um mesmo microtubo. Preparar dois microtubos para cada animal.

Armazenar em álcool 100% e se possível, guardar no freezer, até o envio para o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES/UFES, São Mateus, ES.

- Procedimento de coleta por tecido

Resumo das amostras a ser coletadas por tecido (veja detalhamento acima):

- Músculo: duas alíquotas (para mercúrio + elementos, e para isótopos);
- Fígado: duas alíquotas com coleta diferente (para mercúrio + elementos, e para HPAs);
- Rim esquerdo: uma alíquota (para mercúrio + elementos);
- Gordura: duas alíquotas com mesma coleta (para organoclorados + organobromados e para HPAs);
- Gônadas;
- Dentes;
- Pele ou músculo (preferencialmente) para genética.

- Procedimento de coleta por estágio da carcaça

Resumo das amostras a ser coletadas dependendo do estágio de decomposição da carcaça (veja detalhamento no quadro abaixo (Quadro 29):

Quadro 29: Detalhamento do resumo das amostras a serem coletadas.

| Código de decomposição | Mercúrio + elementos | Clorados + bromados | HPAs | Isótopos | Genética |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 2 | M, F, R | G | G | M | M ou P |
| 3 | M, F, R | G | G | M | M ou P |
| 4 | - | - | - | - | M ou P |
| 5 | - | - | - | - | M ou P |

❖ Histopatologia

Com a certificação do óbito dos animais encontrados nas praias será realizada a necrópsia com retirada de fragmento de tecidos para avaliação histopatológica no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) do Hospital Veterinário da UENF.

Durante a necropsia os órgãos serão avaliados macroscopicamente quanto a forma, textura, consistência e coloração das superfícies e, os com suspeita de lesões, serão coletados em fragmentos com até 1 cm de espessura e imediatamente fixados em formalina neutra tamponada a 10%, excetuando-se o coração, que será colhido inteiro e imediatamente incidido transversalmente para fixação de átrios e ventrículos.

Caso não sejam observadas lesões aparentes, é recomendado, pelo menos, a retirada de fragmentos dos seguintes órgãos: músculo, fígado, rim, gordura, gônadas, dentes e pele, os quais passarão pelo mesmo processo de fixação anteriormente citados.

Todo o material será fixado por um período mínimo de 48 horas. A relação dos parâmetros a serem monitorados é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. Relação dos parâmetros histopatológicos a serem avaliados para os cetáceos na área monitorada.

| Amostras | Análise |
|-----------------|-----------------|
| Músculo | Histopatológica |
| Fígado | Histopatológica |
| Rim | Histopatológica |
| Gordura | Histopatológica |
| Gônadas | Histopatológica |
| Dentes | Histopatológica |
| Pele | Histopatológica |

❖ Microbiologia

Para as análises bacteriológicas, as amostras com lesões serão coletadas por meio de swabs estéreis os quais deverão ser remetidos refrigerados em caixa, isotérmica, com meio de transporte adequado para cada análise, ao laboratório imediatamente após o término das colheitas, para facilitar o isolamento do agente infeccioso. Os swabs serão encaminhados para o Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Hospital Veterinário da UENF.

Posteriormente, serão semeados e processados em meios de cultura (caldos e/ou em agar), como agar sangue, agar macconkey, agar saboraud, agar mueller hinton, entre outros, para o crescimento

de micro-organismos patogênicos. Em seguida, as amostras serão incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24/48 hs. As amostras que apresentarem crescimento bacteriano serão repicadas em meios de cultivo próprios e analisadas através de métodos de coloração específica. Após esse processo, será feita a identificação microbiana, com a realização de análises por métodos bioquímicos ou por kits de identificação microbiológica. A seguir, com os micro-organismos identificados, serão realizados os antibiogramas e/ou antifungogramas para posterior confecção dos laudos.

5.6.6 Monitoramento de tartarugas marinhas

❖ Obtenção das amostras de tartarugas em reprodução

O monitoramento de tartarugas-marinhas em reprodução será realizado durante as temporadas reprodutivas em Linhares, ES. A temporada reprodutiva se estende de setembro a maio, porém as campanhas de coleta de sangue das fêmeas serão feitas de outubro a janeiro, pois o baixo número de desova em setembro, fevereiro, março, abril e maio inviabiliza o trabalho de campo. As coletas de sangue e ovos serão realizadas à noite durante a temporada reprodutiva de segunda a sexta-feira. A coleta de ovos e filhotes natimortos será feita diariamente, pela manhã de novembro até janeiro.

As praias serão monitoradas com quadriciclo com tração 4x4 das 20 às 4h em busca de fêmeas em desova pela equipe TAMAR. A equipe RRDM será acionada por celular e se deslocará em veículo 4x4 até o ponto de acesso à praia mais próximo da desova.

A captura das *Caretta caretta* será manualmente logo após a postura. Após a captura, todos os animais serão contidos por meio da contenção física manual para tomada de dados biométricos e coleta de material biológico necessário para o desenvolvimento do trabalho.

Após serem capturados, imediatamente será feita a coleta de sangue no menor tempo possível. Serão tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em metros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também será obtida massa com dinamômetro analógico com capacidade de 200 Kg com escala mínima de 0,2 Kg.

Os animais capturados serão identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Os ovos serão coletados no momento da desova (sendo 3 por ninho de *C. caretta*, totalizando 90, e até 45 ovos de *D. coriacea*) sem contato com o solo, que serão armazenados congelados a -80°C

em sacolas plásticas. O ninho será georreferenciado e monitorado para que filhotes natimortos (aproximadamente 3 por ninho) e ovos não eclodidos sejam coletados após o nascimento dos filhotes, armazenados congelados em sacolas plásticas a -80°C . O monitoramento dos ninhos e coleta de filhotes natimortos e ovos gorados poderá ser realizado pela equipe do Projeto TAMAR que também obterá os dados de eclodibilidade.

Serão coletadas amostras de sangue de aproximadamente 3 tartarugas *C. caretta* fêmeas em reprodução por noite de monitoramento, somando 60 ao longo da temporada reprodutiva, uma média de 10 por mês. Não serão coletadas amostras sanguíneas de *D. coriacea* devido à dificuldade de obtenção e o estresse excessivo dos animais. As amostras sanguíneas serão centrifugadas para obtenção de plasma e soro, que serão congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C .

Amostras sanguíneas serão coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 40 x 1,2 mm e seringas descartáveis, obtendo-se um volume de 10 mL, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo. Imediatamente após a coleta, serão realizados 5 esfregaços sanguíneos com sangue sem anticoagulante. As amostras serão fracionadas em tubos contendo heparina sódica e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C . Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime será destinada a realização do hemograma e o restante será centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras serão estocadas em ultra congelador a -84°C até posterior análise.

Amostras de tecido das tartarugas marinhas serão obtidas por meio de uma excisão dermatológica utilizando-se um punch estéril e descartável de 6.0 mm de dimensão. Cada tecido removido será armazenado e devidamente etiquetado em tubos do tipo eppendorf de 2,0 mL contendo etanol absoluto para preservação do material até seu transporte ao LGEM-UFES.

Os ovos e os filhotes serão homogeneizados em “pools” de 3 ovos ou filhotes por ninho totalizando assim 30 amostras de pool de ovos e 30 de filhotes de *C. caretta* e 15 de *D. coriacea*. No total serão obtidas 750 amostras entre plasma, ovos e filhotes de *C. caretta* a serem analisadas.

❖ Obtenção de amostras de tartarugas juvenis nas áreas de alimentação

Serão realizadas 4 campanhas de captura de *Chelonia mydas* juvenis na APA Costa das Algas em Santa Cruz, próximo à foz do rio Piraquê-açu, Aracruz, ES e 4 campanhas no Recife de Coroa Vermelha - BA. Por ano serão capturados 45 indivíduos em cada área de alimentação.

A captura de *Chelonia mydas* juvenis será por busca ativa ou com uso de rede de espera de nylon com malha de 8 cm, 6 metros de largura e 200m de comprimento (SANTOS, 2005). A rede será lançada a partir de um barco motorizado e fixada ao fundo com âncora a uma distância de 10 a 200 metros da praia. Após armada, a rede será monitorada continuamente para evitar lesões nos

animais que forem capturados. O tempo de esforço será de 4 a 6 horas diárias a depender das condições climáticas e oceanográficas.

Após serem capturadas, serão tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), medido do ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal e largura curvilínea da carapaça (LCC) medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais, ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também será obtida a massa de juvenis de *C. mydas* com uso de dinamômetro digital com capacidade para 50Kg com escala mínima de 0,1g.

Os animais capturados serão identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Amostras sanguíneas serão coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 25 x 0,7 mm em juvenis e seringas descartáveis, obtendo-se um volume entre 3 e 30 mL de acordo com o tamanho dos animais, respeitando o limite máximo de 0,5% do peso vivo (SANTOS *et al.*, 2015). Imediatamente após a coleta, serão realizados cinco esfregaços sanguíneos com sangue sem anticoagulante. As amostras serão fracionadas em tubos contendo heparina sódica e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime será destinada a realização do hemograma e o restante será centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido enquanto estiver em campo. Após envio ao laboratório as amostras serão estocadas em ultra congelador a -84°C até posterior análise bioquímica e envio ao laboratório de referência (FURG).

Amostras de tecido das tartarugas marinhas serão obtidas por meio de uma excisão dermatológica utilizando-se um *punch* estéril e descartável de 6.0 mm de dimensão. Cada tecido removido será armazenado e devidamente etiquetado em tubos do tipo *ependorf* de 2,0 mL contendo etanol absoluto para preservação do material até seu transporte ao LGEM-UFES.

❖ Remessa de amostras

As amostras de plasma, ovos e natimortos serão encaminhadas ao laboratório de referência (FURG) e deverão ser armazenadas em caixas de isopor contendo gelo seco e transportadas em caminhão frigorífico congeladas a -10 °C, sob responsabilidade da RDDM. As amostras de tecidos para análise genética deverão ser encaminhadas em temperatura ambiente para o Laboratório de Genética e Evolução Molecular da UFES (LGEM-UFES).

As amostras de plasma para provas bioquímicas deverão ser enviadas congeladas em isopor com gelo reciclável para o IMD. As amostras serão enviadas acompanhadas de uma lista com seus

respectivos códigos de identificação para verificação no destino. Qualquer incoerência deve ser informada ao escritório de projetos e ao IMD.

5.7 ANEXO 7. MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA DULCÍCOLA, MARINHA E ESTUARINA

5.7.1 Sistema aquático dulcícola

A malha amostral do sistema aquático dulcícola (rios e lagos) é composta por 08 estações, sendo 4 na calha fluvial do Rio Doce, 1 em rio tributário e 7 em lagos (Figura 51 e Tabela 15). Esse arranjo espacial foi aprovado na Reunião da Câmara Técnica de Biodiversidade – CTBio de 18/07/2018. Foi incluída a estação à jusante da Usina Hidrelétrica - UHE de Mascarenhas, a qual servirá como referência para avaliação das condições geoquímicas da água do Rio Doce após o último represamento na calha do Rio Doce. As estações dos lagos Nova, Juparanã e Limão foram reposicionadas a fim de localizar a amostragem de água e sedimento em regiões com maior profundidade, o que favorece ao processo de sedimentação e restringe a resuspensão. Foi incluída mais estação amostral na lagoa Monsarás devido a influência marinha nesse ecossistema.

Figura 51. Malha amostral dos ecossistemas aquáticos dulcícola, estuarino e marinho.

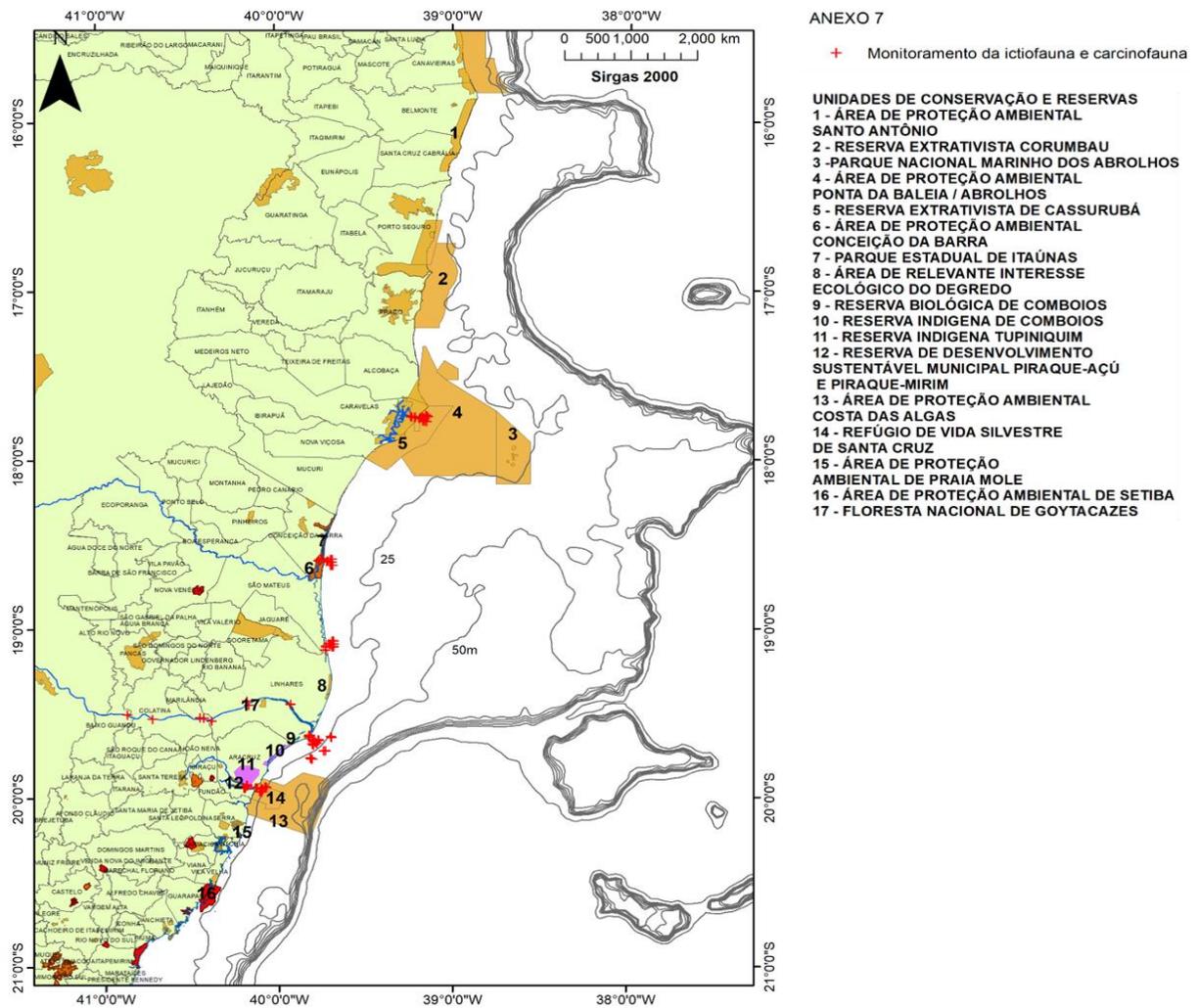


Tabela 15. Coordenadas (datum, WGS 1984) das estações amostrais do monitoramento dos ecossistemas aquáticos continentais (Anexo 7).

| Ponto de Amostragem | Área/Tipo de Estudo | Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGASS2000) | |
|---------------------|---------------------|---|------------|
| | | x | y |
| Ponto 1 | Rio Doce | 305077,58 | 7841603,14 |
| Ponto 2 | | 350963,58 | 7839489,41 |
| Ponto 3 | | 377966,41 | 7848097,06 |
| Ponto 4 | | 402950,58 | 7848549,33 |
| Ponto 5 | | 355728,46 | 7837501,13 |
| Ponto 6 | | 348718,03 | 7839780,93 |
| Ponto 7 | | 376785,70 | 7850610,93 |
| Ponto 8 | | 320335,78 | 7838805,01 |

❖ Avaliação ambiental

Será realizada conforme metodologia de Nessimian et al. (2008) (Tabela 16).

Tabela 16. Características do habitat utilizados na avaliação de sítios de amostragem para cálculos de índice de integridade de habitat

| Características do habitat | |
|--|---|
| Padrão de uso da terra além da zona ripária: | |
| Floresta primária contínua / fragmento de 1.000.000 m ² / fragmento 100.000m ² | 6 |
| Floresta secundária alta/Floresta secundária mista | 5 |
| Floresta secundária baixa | 4 |
| Pastagem | 3 |
| Culturas perenes | 2 |
| Culturas de ciclo curto / solo exposto | 1 |
| Largura da mata ciliar: | |
| Floresta contínua | 6 |
| Floresta com largura entre 30 e 100 m | 5 |
| Floresta com largura entre 5 e 30 m | 4 |
| Floresta com largura entre 1 e 5 m | 3 |
| Floresta ripária ausente, mas com algumas espécies arbustivas e árvores pioneiras | 2 |
| Mata ciliar e vegetação arbustiva ausentes | 1 |
| Integralidade da mata ciliar: | |
| Mata ciliar intacta, sem pausas na vegetação | 4 |
| Interrupções ocorrendo em intervalos de 50 m | 3 |
| Pausas frequentes com erosões e machas a cada 50 m | 2 |

| | |
|--|---|
| Características do habitat | |
| Profundamente marcado por erosões ao longo de todo o seu comprimento | 1 |
| Vegetação da zona ripária a menos de 10 m do canal: | |
| Mais de 90% da densidade de plantas constituída por árvores não pioneiras ou arbustos | 4 |
| Misto de espécies pioneiras e árvores maduras | 3 |
| Misto de gramíneas, árvores pioneiras esparsas e arbustos | 2 |
| Gramíneas e alguns arbustos | 1 |
| Dispositivos de retenção: | |
| Canal com pedras e/ou troncos velhos firmemente fixados no local | 4 |
| Rochas e/ou trocos presentes, mas cobertos com sedimento | 3 |
| Dispositivos de retenção soltos, que se movem com o fluxo | 2 |
| Canal com areia e poucas obstruções | 1 |
| Sedimentos do Canal: | |
| Pouco ou nenhum alargamento do canal resultante do acúmulo de sedimentos | 4 |
| Algumas pedras e pouco silte | 3 |
| Sedimento formado por pedras; areia e silte comuns | 2 |
| Canal com presença de ilhas ou com fluxo alterado | 1 |
| Estrutura do banco: | |
| Bancos pouco visíveis | 5 |
| Bancos estáveis, formados por rochas e solo firme, apresentando gramíneas, arbustos ou raízes de árvores | 4 |
| Bancos firmes, mas nem sempre mantidos por gramíneas e arbustos | 3 |
| Bancos de terra solta mantidos por uma camada esparsa de gramíneas e arbustos | 2 |
| Bancos instáveis, facilmente alteráveis, com terra solta ou areia | 1 |
| Erosão: | |
| Pouca, não evidente ou restrita a áreas com apoio da raiz | 4 |
| Somente em curvas e estreitamentos | 3 |
| Frequente, erosão das margens e raízes | 2 |
| Erosão severa ao longo do canal, queda de bancos | 1 |
| Leito do rio: | |
| Fundo de pedra de vários tamanhos, interstícios evidentes | 4 |
| Fundo de pedras que se movem com facilidade, com pouco silte | 3 |
| Fundo de silte, cascalho e areia, estável em alguns lugares | 2 |
| Fundo instável e uniforme de areia e silte, substrato rochoso ausente | 1 |
| Corredeiras e piscinas, ou meandros: | |
| Distintos, ocorrendo em intervalos de 5-79 de largura | 4 |
| Irregularmente espaçados | 3 |
| Piscinas longas separam corredeiras curtas, meandros ausentes | 2 |

| Características do habitat | |
|--|---|
| Meandros e corredeiras/piscinas ausentes | 1 |
| Vegetação aquática: | |
| Quando presente, consiste de musgos e manchas de algas | 4 |
| Algas dominantes em piscinas, plantas vasculares ao longo da borda | 3 |
| Tapetes de algas presentes, algumas plantas vasculares, poucos musgos | 2 |
| Tapetes de algas cobrem a parte inferior, plantas vasculares dominam o canal | 1 |
| Detrito: | |
| Consistindo principalmente de folhas e madeira, sem sedimento | 5 |
| Consistindo principalmente de folhas e madeira, com sedimento | 4 |
| Poucas folhas e madeira, detritos orgânicos, com sedimento | 3 |
| Sem folhas, galhos e troncos, matéria orgânica fina e grossa, com sedimento | 2 |
| Sedimento anaeróbico fino, sem matéria orgânica grossa | 1 |

❖ **Avaliação dos parâmetros abióticos**

Serão estimados os parâmetros: oxigênio dissolvido, turbidez, salinidade, condutividade e temperatura e pH.

❖ **Esforço de coleta**

Serão utilizados para amostragem os seguintes petrechos de pesca: Redes de espera, redes de arrasto, tarrafas, puçás e pesca elétrica. Cada petrecho será utilizado de forma a realizar de maneira mais eficiente possível a amostragem dos espécimes. Todos os petrechos serão utilizados dentro do trecho de rio de 150 determinado a priori pela equipe.

O esforço de coleta será padronizado da seguinte forma:

- As redes de espera serão colocadas às 16-17 horas, revistadas às 19:30 horas e retiradas às 23:30. As redes de arrasto serão passadas 10 vezes num trecho de 100 metros;
- O esforço de coleta com tarrafas será de 15 lances com 100 metros de amostragem para cada tamanho de malha (pequena e média);
- A amostragem com pesca elétrica será de 100 metros, com duas passadas de 40 minutos cada.

❖ **Acondicionamento dos peixes coletados**

Na margem, os peixes serão eutanasiados e uma amostra de tecido será retirada de cada espécime. No caso de coleta de espécimes diminutos, os mesmos serão fixados e mantidos em etanol 95% para identificação e retirada de tecido posterior. A coleta de novas espécies será sempre registrada em imagens digitais, com escala métrica e fundo padronizado.

Após amostragem, os espécimes serão fixados em formol 10% (4%) e mantidos em recipientes adequados durante 24-48 horas até a sua transferência para álcool 70%.

5.7.2 Sistema aquático marinho

Neste anexo, sempre que o sacrifício dos peixes e crustáceos for necessário, este se dará de acordo com a Diretriz da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Ictiofauna e carcinofauna estuarina/marinha será amostrada mensalmente com redes de arrasto de fundo com portas em 05 estuários e áreas marinhas adjacentes. As amostragens serão realizadas nos pontos determinados no TR4 – Anexo 7, podendo haver pequenos deslocamentos nestes pontos, conforme dificuldades apresentadas em campo (presença de pedras, galhos, ou outros elementos que impeçam ou dificultem o funcionamento/operação da rede). Além do rio Doce (micro e macroescala), serão amostrados estuários e áreas marinhas adjacentes, ao sul (rio Piraquê-Açu, apenas ictiofauna) e ao norte (rios Ipiranga, São Mateus e Caravelas), conforme disposto na (Figura 51 e no Quadro 30)

Quadro 30. Pontos de amostragem da ictiofauna e carcinofauna estuarina/marinha (Anexo 7) nos estuários (rio Piraquê-Açu, rio Doce, rio Ipiranga, rio São Mateus e rio Caravelas) e áreas marinhas adjacentes, localizados ao norte do Espírito Santo e sul da Bahia.

| Pontos | Local | Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGASS2000) | |
|--------|---|---|------------|
| | | E | N |
| PA0,U | rio Piraquê-Açu e área marinha adjacente (apenas ictiofauna) | 375820,22 | 7793544,25 |
| PA1,U | rio Piraquê-Açu e área marinha adjacente (apenas ictiofauna) | 376858,51 | 7794813,34 |
| PA2,U | rio Piraquê-Açu e área marinha adjacente (apenas ictiofauna) | 382853,89 | 7793805,00 |
| PA3,U | rio Piraquê-Açu e área marinha adjacente (apenas ictiofauna) | 384973,95 | 7793562,60 |
| PA4,U | rio Piraquê-Açu e área marinha adjacente (apenas ictiofauna) | 386548,77 | 7794865,64 |
| PA5,U | rio Piraquê-Açu e área marinha adjacente (apenas ictiofauna) | 384597,91 | 7791417,55 |
| 1U | rio Doce e área marinha adjacente – microescala (apenas ictiofauna) | 415006,43 | 7830273,22 |
| 4U | rio Doce e área marinha adjacente – microescala (apenas ictiofauna) | 418254,77 | 7823487,01 |
| 5U | rio Doce e área marinha adjacente – microescala (apenas ictiofauna) | 419688,59 | 7825088,34 |
| - | - | 416306,07 | 7822093,09 |
| 7U | rio Doce e área marinha adjacente – microescala (apenas ictiofauna) | 423673,44 | 7818070,29 |
| 8U | rio Doce e área marinha adjacente – microescala (apenas ictiofauna) | 427261,81 | 7827151,81 |

| 9U | rio Doce e área marinha adjacente – microescala (apenas ictiofauna) | 415382,72 | 7812452,33 |
|--------|---|---|------------|
| 2U,C | rio Doce e área marinha adjacente - macro e microescala (apenas ictiofauna) | 414329,06 | 7828656,64 |
| 3U,C | rio Doce e área marinha adjacente - macro e microescala (apenas ictiofauna) | 416400,12 | 7825016,13 |
| Pontos | Local | Coordenadas UTM (<i>datum</i> SIRGASS2000) | |
| | | E | N |
| 7C | rio Doce e área marinha adjacente - macroescala | 423673,36 | 7818070,29 |
| 8C | rio Doce e área marinha adjacente - macroescala | 427261,88 | 7827151,7 |
| 9C | rio Doce e área marinha adjacente - macroescala | 415382,84 | 7812452,22 |
| SM1 | rio São Mateus e área marinha adjacente | 419729,59 | 7942784,41 |
| SM2 | rio São Mateus e área marinha adjacente | 421462,99 | 7943423,34 |
| SM3 | rio São Mateus e área marinha adjacente | 425157,36 | 7942551,23 |
| SM4 | rio São Mateus e área marinha adjacente | 427286,31 | 7941979,87 |
| SM5 | rio São Mateus e área marinha adjacente | 427434,80 | 7943853,9 |
| SM6 | rio São Mateus e área marinha adjacente | 426991,40 | 7939871,21 |
| IP1 | rio Ipiranga e área marinha adjacente | 424013,53 | 7884327,83 |
| IP2 | rio Ipiranga e área marinha adjacente | 424094,34 | 7886336,00 |
| IP3 | rio Ipiranga e área marinha adjacente | 426353,13 | 7888255,86 |
| IP4 | rio Ipiranga e área marinha adjacente | 428344,27 | 7888328,88 |
| IP5 | rio Ipiranga e área marinha adjacente | 428450,26 | 7890307,28 |
| CA1 | rio Caravelas e área marinha adjacente | 475405,82 | 8037150,94 |
| CA2 | rio Caravelas e área marinha adjacente | 477401,86 | 8037053,43 |
| CA3 | rio Caravelas e área marinha adjacente | 481416,74 | 8036975,53 |
| CA4 | rio Caravelas e área marinha adjacente | 483414,25 | 8036824,55 |
| CA5 | rio Caravelas e área marinha adjacente | 484155,18 | 8038597,45 |
| CA6 | rio Caravelas e área marinha adjacente | 482490,58 | 8035062,53 |

- Variáveis ambientais

Em cada ponto, antes de cada arrasto, para a mensuração das variáveis ambientais será coletada água de fundo (utilizando-se uma garrafa de van Dorn) e superfície (manualmente, utilizando recipiente plástico). Temperatura (°C), salinidade, pH, Oxigênio Dissolvido (OD, %), turbidez (NTU) e profundidade (m) serão mensuradas utilizando-se sonda multiparâmetros devidamente calibrada (Quadro 31).

Quadro 31. Parâmetros ambientais a serem medidos em cada ponto de coleta da ictiofauna estuarina/marinha (Anexo 7) nos estuários (rios Piraquê-Açu, Doce, Ipiranga, São Mateus e Caravelas) e áreas marinhas adjacentes, localizados ao norte do Espírito Santo e sul da Bahia

| Parâmetros físicos e químicos (antes do início do arrasto) | Parâmetros físicos (durante o arrasto, minutos 0, 1, 2, 3, 4 e 5) |
|---|--|
| temperatura (°C) | coordenadas |
| salinidade | profundidade |
| pH | - |
| OD (%) | - |
| turbidez (NTU) | - |

Durante o arrasto, a cada minuto (minutos 0, 1, 2, 3, 4 e 5), serão registradas as coordenadas e a profundidade através de uma ecosonda. Os dados serão anotados nas fichas de campo (Quadro 32 e Figura 52).

Quadro 32. Ficha de campo 1.

| Local de Coleta: | | | Anotador(a): | | | | | Data: | |
|--|---------|------------|--------------------|------------------|----|--------|----------------|-----------------|-------------|
| Fase da Luz: | | | | | | | | Hora Inicial: | Hora final: |
| Clima: () Ensolarado () Nublado () Chuvisco Outros: _____ | | | | | | | | | |
| Ponto | Arrasto | Prof. | Parâmetros in situ | | | | | | Observações |
| | | | Temperatura (°C) | Salinidade (PSU) | pH | OD (%) | Turbidez (NTU) | Clorofila a (7) | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |
| | | Superfície | | | | | | | |
| | | Fundo | | | | | | | |

Figura 52. Ficha de campo 2.

FICHA DE CAMPO (p. 2/2)

Data: ___/___/___

Área/estuário: _____, Anotador (a): _____

Equipe: _____

| Ponto | Arrasto | Prof 0 | Prof 1' | Prof 2' | Prof 3' | Prof 4' | Prof 5' | Ponto | Arrasto | Coord 0 | Coord 1' | Coord 2' | Coord 3' | Coord 4' | Coord 5' |
|-------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | 3 | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | 3 | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | 3 | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | 3 | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | 3 | | | | | | | |
| 1 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | 3 | | | | | | | |

Observações (arrastos vazios, clima, etc.): _____

❖ Amostragem para estudos de composição e estrutura de populações e comunidades de peixes e crustáceos estuarino/marinhos

Para a coleta dos peixes estuarino/marinhos, em cada ponto serão realizados três arrastos (duração de 05 minutos cada), utilizando-se uma rede de arrasto de fundo com portas (“balão” ou “wing trawl”), com as seguintes especificações: tralha superior PES 5mm com 8,62m de comprimento e tralha inferior PES 8mm com 10,43m de comprimento. Peso do chumbo equivalente a 1,62 kg sendo 27 unidades de 60 gramas. Malha 13mm, fio 210/09 nas mangas e barriga; malha 5mm, fio 210/12 no saco. Portas de madeira vazada com as dimensões de 70cm x 42cm e peso de 9,3 kg cada.

Após a coleta, os peixes serão anestesiados em solução de benzocaína até eutanásia e após, acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados (Quadro 33) quanto ao ponto, arrasto, local e data de coleta, e mantidos resfriados até o transporte para o laboratório responsável, onde serão mantidos até o momento do processamento.

Quadro 33. Exemplo de etiqueta para identificação de amostras

| |
|--|
| RRDM Laboratório Data: / / Estuário: Ponto/arrasto: |
|--|

No laboratório, as amostras serão recebidas pelo técnico responsável, que conferirá a identificação das mesmas, o acondicionamento (integridade dos sacos plásticos, das etiquetas, etc.) e, logo após as armazenarão em freezer (-20°C).

❖ Amostragem para estudos de microquímica de otólitos

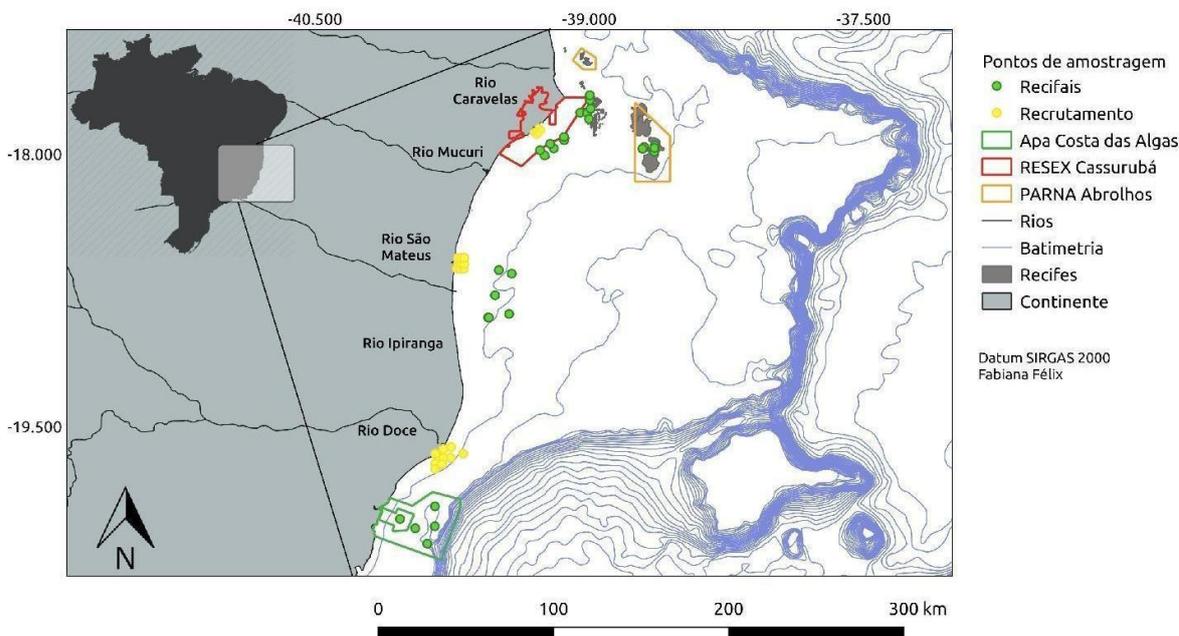
Através de coleta exaustiva, para os estudos da utilização do estuário do rio Doce e áreas marinhas adjacentes, através da microquímica de otólitos, alguns exemplares de peixes coletados no item acima (preferencialmente de espécies de grande porte e/ou interesse comercial), serão aproveitados. Além destes, em coletas exaustivas mensais, exemplares de espécies de grande porte/interesse comercial que utilizam o estuário serão coletados. Para tanto, serão empregadas redes de emalhe, espinheis, linhas de mão e outros artefatos necessários, de acordo com a disponibilidade da espécie.

❖ Amostragem para estudos de ictiofauna recifal

• Área de estudo

O desenho amostral utilizado foi baseado no desenho assimétrico do tipo Beyond-BACI (UNDERWOOD, 1994) idealizado para estudos de impacto ambiental. Foram escolhidas 5 zonas de estudo: Impacto (I) = APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz, o Controle I (C1) = Recifes Esquecidos, o Controle II (C2) = Recifes adjacentes RESEX Cassurubá (Sebastião Gomes, Coroa Vermelha e Nova Viçosa), o Controle III (C3) = Parcel das Paredes e Controle IV (C4) = PARNA dos Abrolhos. Em cada zona foram determinados seis setores aleatórios conforme o mapa da amostragem (Figura 53 e Quadro 34) e em cada um deles amostrados seis pontos fixos. O fator aleatório com seis níveis foi definido no intuito de estabelecer réplicas espaciais, aumentar a variabilidade espacial e a potência do desenho aplicado.

Figura 53: Mapa da amostragem nas áreas recifais para avaliação das dinâmicas populacionais e de assembleia de peixes recifais (pontos verdes) assim como dos locais de colocação das armadilhas de luz para avaliação do recrutamento de peixes marinhos e estuarinos (pontos amarelos) no norte do Espírito Santo e sul da Bahia



Quadro 34: Pontos de amostragem de peixes recifais (Anexo 7) no norte do Espírito Santo e sul da Bahia

| Local | Ponto | Coordenadas UTM – 24K | |
|--|-------|-----------------------|-----------|
| | | X | Y |
| APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz | IS1 | 379516.0 | 7777822.0 |
| APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz | IS2 | 382651.0 | 7777822.0 |
| APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz | IS3 | 381249.0 | 7786523.0 |
| APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz | IS4 | 390642.0 | 7785862.0 |
| APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz | IS5 | 385681.0 | 7794858.0 |
| APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz | IS6 | 389385.0 | 7803589.0 |
| Recifes Esquecidos | C1S1 | 447820.9 | 7939121.1 |
| Recifes Esquecidos | C1S2 | 455177.7 | 7937015.5 |
| Recifes Esquecidos | C1S3 | 441813.5 | 7910334.5 |
| Recifes Esquecidos | C1S4 | 441750.4 | 7910301.1 |
| Recifes Esquecidos | C1S5 | 442098.1 | 7910257.9 |
| Recifes Esquecidos | C1S6 | 453782.8 | 7912448.3 |
| Recifes Esquecidos | C1S7 | 445681.5 | 7923856.6 |
| Recifes adjacentes RESEX Cassurubá | C2S1 | 474117.5 | 8009056.1 |
| Recifes adjacentes RESEX Cassurubá | C2S2 | 471434.6 | 8012249.8 |
| Recifes adjacentes RESEX Cassurubá | C2S3 | 479416.6 | 8013344.0 |
| Recifes adjacentes RESEX Cassurubá | C2S4 | 477338.1 | 8016107.7 |
| Recifes adjacentes RESEX Cassurubá | C2S5 | 485374.0 | 8018328.0 |
| Recifes adjacentes RESEX Cassurubá | C2S6 | 485330.2 | 8020341.5 |
| Parcel das Paredes RESEX Cassurubá | C3S1 | 494710.7 | 8035127.0 |
| Parcel das Paredes RESEX Cassurubá | C3S2 | 498675.0 | 8034873.2 |
| Parcel das Paredes RESEX Cassurubá | C3S3 | 499766.8 | 8031288.7 |
| Parcel das Paredes RESEX Cassurubá | C3S4 | 500720.9 | 8037550.6 |
| Parcel das Paredes RESEX Cassurubá | C3S5 | 500349.9 | 8042761.4 |
| Parcel das Paredes RESEX Cassurubá | C3S6 | 500286.3 | 8045759.5 |
| PARNA dos Abrolhos | C4S1 | 531839.3 | 8013672.0 |

| Local | Ponto | Coordenadas UTM – 24K | |
|--------------------|-------|-----------------------|-----------|
| | | X | Y |
| PARNA dos Abrolhos | C4S2 | 531755.4 | 8014158.9 |
| PARNA dos Abrolhos | C4S3 | 530726.7 | 8013131.7 |
| PARNA dos Abrolhos | C4S4 | 537835.2 | 8015110.7 |
| PARNA dos Abrolhos | C4S5 | 537594.9 | 8011283.1 |
| PARNA dos Abrolhos | C4S6 | 537652.2 | 8013573.2 |

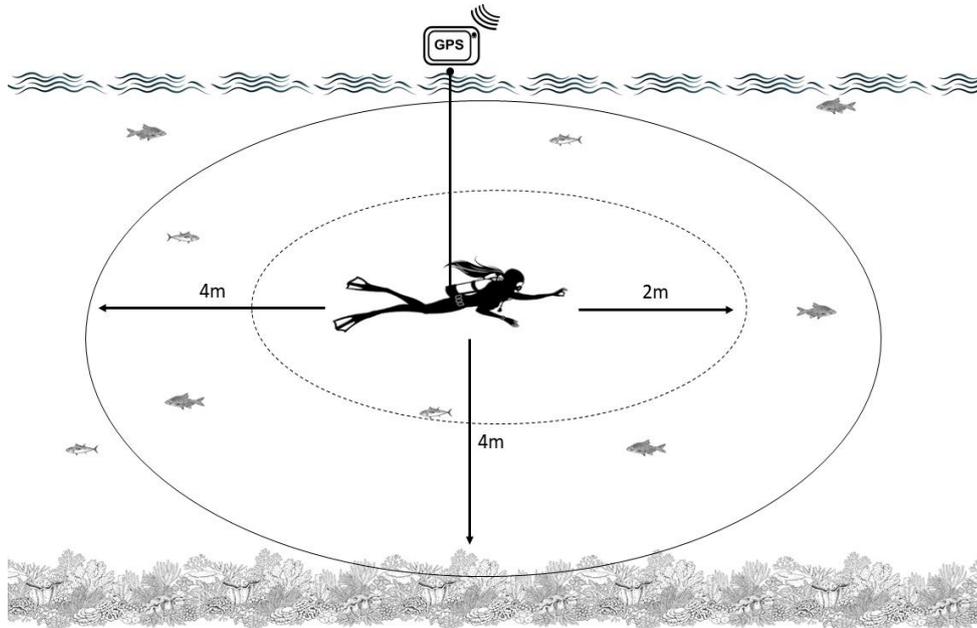
- Coleta de dados

Os mergulhos são realizados em duplas com uso de equipamento autônomo (SCUBA), onde um mergulhador é responsável pelo censo e o outro mergulhador pelo foto-quadrado. As duplas se deslocaram para pontos designados no setor amostrado. O censo foi realizado pela técnica do ponto fixo, onde o mergulhador conta os peixes que se encontram no interior de um cilindro tridimensional imaginário de raio conhecido (4m). Para delimitar a área amostrada do ponto fixo, uma trena foi estendida, limitando a área do censo em 8 m de diâmetro, sendo definido um raio de 4 m para peixes > 20 cm e um raio de 2 m para os peixes crípticos < 20 cm (MINTE-VERA et al., 2008), durante 5 min. (Figura 54). Durante o censo são identificadas as espécies de peixes, estima-se a abundância de indivíduos em classes de abundância, e o tamanho em classes de 2 em 2 cm (HACKRADT et al., 2011).

Após a finalização do censo visual, o mergulhador registra informações referentes a estrutura do habitat dentro da área do cilindro. Dados de Heterogeneidade e Complexidade do habitat foram anotados conforme descrito abaixo:

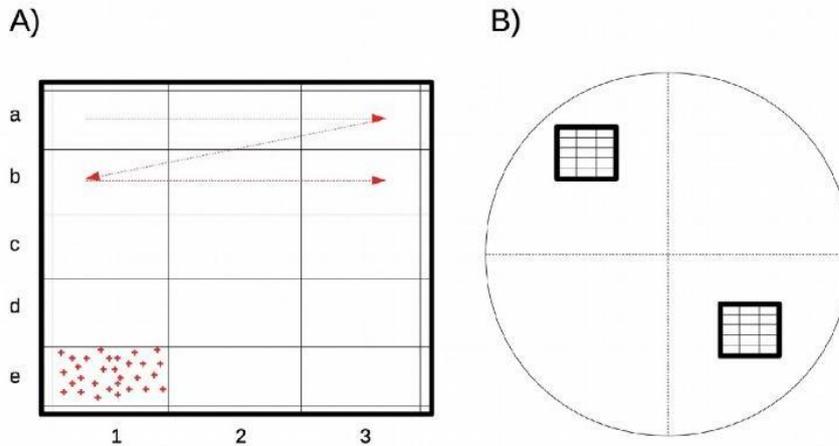
- Heterogeneidade do habitat (estimado visualmente dentro de cada $\frac{1}{4}$ do cilindro):
 - % recife (substrato consolidado);
 - % de areia (substrato inconsolidado nú);
 - % de pradarias (substrato inconsolidado revestido por macroalgas ou fanerógamas);
 - % de cascalho (substrato inconsolidado recoberto por seixos/cascalho, rodolito ou coral fragmentado).
- Complexidade do habitat (estimado visualmente dentro de $\frac{1}{4}$ do cilindro):
 - Número de buracos (por classes <20, 21-50, >50);
 - Rugosidade (escala de 1 a 5 – sendo 1= liso até 5= muito enrugado e alto);
 - Inclinação do terreno – determinada a partir de uma escala visual e categorizada de 0-30°, 30-60°, 60-90°, >90°;
 - Profundidade anotada em metros.

Figura 54: Exemplo esquemático de amostragem de assembléia e populações de peixes recifais através de ponto fixo.



Adicionalmente, a cobertura do substrato foi amostrada pelo segundo mergulhador, após a finalização do censo visual. Foi utilizado um foto-quadrado de 80 x 70cm, subdivididos em 15 fotos de 17 x 22 cm (Figura 55), tomadas sempre da esquerda para a direita e de cima para baixo. Cada foto foi enumerada segundo o quadrante em que está posicionada de A1, A2, A3, B1, B2 até E3. As fotos foram realizadas por mergulhadores experientes utilizando máquinas fotográficas semiprofissionais com caixa estanque e flash subaquático. Foram posicionados 2 foto-quadrados dentro da área de cada ponto fixo realizados sempre nos quadrantes NE e SO.

Figura 55: Ilustração do foto-quadrado a ser empregado no estudo. a) Modelo do foto-quadrado a ser utilizado com 15 pequenas fotos identificadas alfanumericamente e a sequência de fotos a serem tiradas, b) Esquema de posicionamento dos foto-quadrados dentro do cilindro dos censos visuais em ponto-fixado.



❖ Recrutamento

- Área de estudo

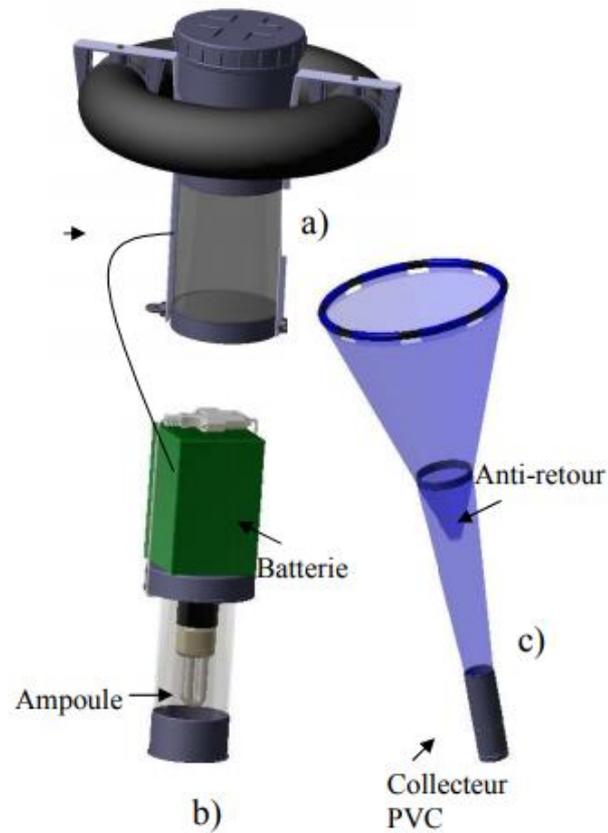
Para a captura das pós-larvas de peixes marinho/estuarinos foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CARE® (ECOCEAN, 2018) durante duas campanhas de amostragem (período chuvoso e seco), realizadas semestralmente segundo o TR4. Nove armadilhas luminosas foram instaladas na desembocadura de quatro rios: LTI = rio Doce, LTC1= rio Piraquê-Açu, LTC2= rio São Mateus e LTC3= rio Mucuri, seguindo o desenho amostral de impacto ambiental Beyond-BACI, para a captura de pós-larvas de peixes estuarinos, nos pontos pré-estabelecido conforme a Figura 1 e Quadro 1. O recrutamento de peixes recifais não estava previsto no plano de trabalho, contudo, aproveitamos as campanhas realizadas para o censo visual e coletamos dados durante a estação chuvosa somente. Para os peixes recifais a mesma quantidade de armadilhas foi distribuída em quatro pontos de amostragem: ABRLT = o arquipélago dos Abrolhos, PABLT= Parcel dos Abrolhos, PPLT= Parcel das Paredes e CALT= Recifes do Arco Costeiro em frente a RESEX do Cassurubá, seguindo um desenho amostral ortogonal (Figura 1 e Quadro 2). Estes pontos foram escolhidos devido a presença de profundidade adequada ao funcionamento da armadilha luminosa (>10 m), segurança para a operação (evitar rotas de embarcações e portos) e relevância ecológica para o estudo.

- Coleta de dados

As armadilhas luminosas são compostas de 03 partes; sistema flutuante / impermeável (que permite que a armadilha fique na superfície da água), parte de iluminação (18 horas de duração da luz, bateria recarregável de chumbo selada 12V / 12, Temporizador de 12V), e a parte de coleta das

pós-larvas (rede cônica de malha 2 x 2 mm, coletor de PVC fixado na extremidade da rede) (ECOCEAN, 2018;(Figura 56).

Figura 56. Desenho esquemático de uma armadilha luminosa do tipo CARE®. Fonte: Ecocean.



As armadilhas serão implantadas na água em uma posição vertical com auxílio de cabos, correntes, âncora e boia de sinalização de superfície (Lecaillon, 2004), como demonstrado na (Figura 58). Sendo que estas serão instaladas a uma distância de aproximadamente 300 m uma da outra (Catalán, 2014; Félix-Hackradt, 2013).

Figura 57: Mapa com a disposição das armadilhas luminosas usadas para o estudo de recrutamento de peixes recifais (1. PABLT= Parcel dos Abrolhos, 2. ABRLT = o arquipélago dos Abrolhos, 3. PPLT= Parcel das Paredes e 4. CALT= Recifes do Arco Costeiro em frente a RESEX do Cassurubá) e estuários (5. LTC3= rio Mucuri, LTC2= rio São Mateus, 7. LTI = rio Doce e 8. LTC1= rio Piraquê-Açu) na área Ambiental 1.

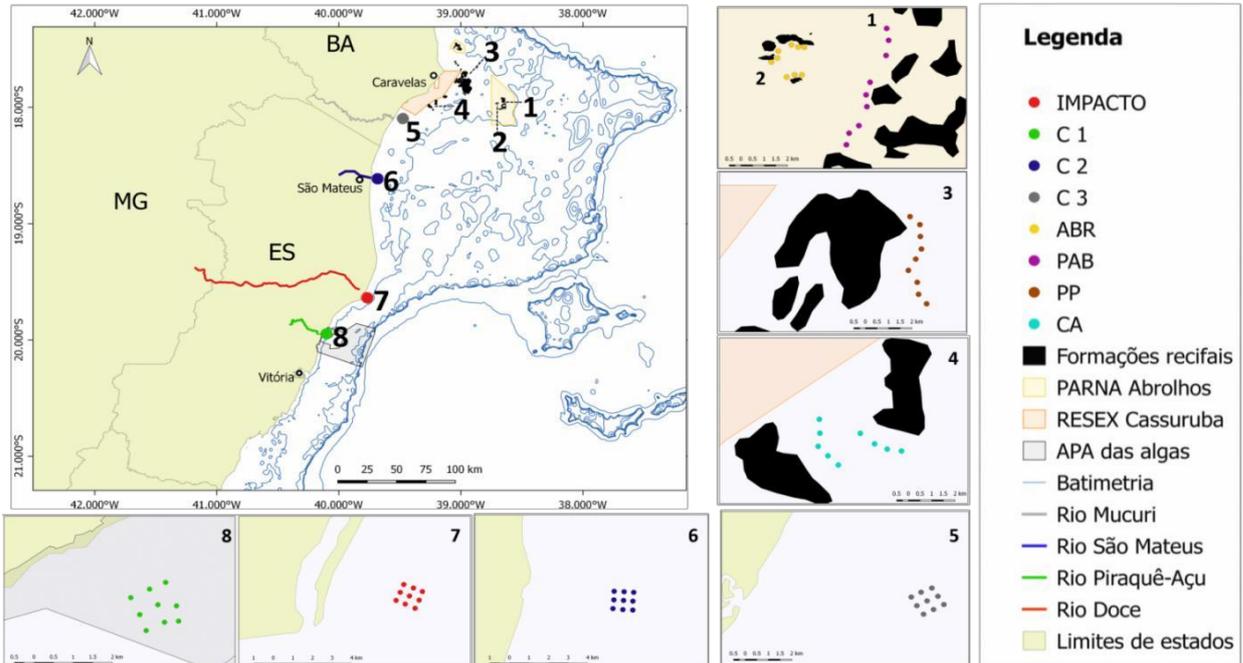
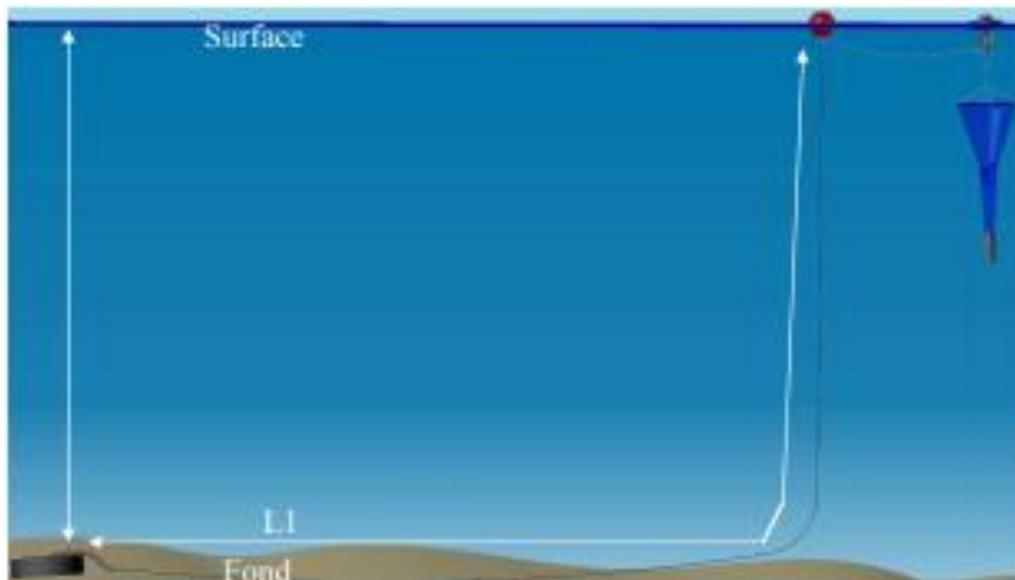


Figura 58. Desenho esquemático de como deve ser instalado a armadilha. Fonte: Ecocean



Primeiramente foi feita a instalação dos kit's de fundeio (âncora, corrente, cabo e bóia), após a verificação da fixação do fundeio procedia-se a instalação (clipagem) das armadilhas de luz. Antes da instalação das armadilhas luminosas quatro procedimentos foram adotados: i- verificar se todas as armadilhas a serem instaladas estão devidamente montadas e com as luzes acesas; ii- verificar

no GPS se o barco está no ponto certo para instalação das armadilhas, iii-verificar a profundidade de instalação das armadilhas, iv- verificar se não há nenhum entrave na rede coletora e os cabos de amarração. As armadilhas foram instaladas a uma distância de aproximadamente 300 m uma da outra (CATALÁN, 2014; FÉLIX-HACKRADT, 2013).

Quadro 35: Pontos de amostragem de recrutamento de pós-larvas estuarinas (Anexo 7) no norte do Espírito Santo e sul da Bahia

| Zona | Ponto | Coordenadas UTM – 24k | |
|------------------------|--------|-----------------------|---------|
| | | X | Y |
| Foz do Rio Doce | LTI-1 | 418951 | 7828145 |
| Foz do Rio Doce | LTI-2 | 419159 | 7828602 |
| Foz do Rio Doce | LTI-3 | 419390 | 7829045 |
| Foz do Rio Doce | LTI-4 | 419420 | 7827938 |
| Foz do Rio Doce | LTI-5 | 419632 | 7828396 |
| Foz do Rio Doce | LTI-6 | 419833 | 7828849 |
| Foz do Rio Doce | LTI-7 | 419921 | 7827704 |
| Foz do Rio Doce | LTI-8 | 420127 | 7828164 |
| Foz do Rio Doce | LTI-9 | 420289 | 7828652 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-1 | 384185 | 7794216 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-2 | 384417 | 7793738 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-3 | 384583 | 7793288 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-4 | 384662 | 7794461 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-5 | 384877 | 7794020 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-6 | 385049 | 7793527 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-7 | 385071 | 7794652 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-8 | 385352 | 7793992 |
| Foz do Rio Piraque-Açu | LTC1-9 | 385408 | 7793560 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-1 | 427561.7 | 7942247 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-2 | 428067.2 | 7942226 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-3 | 428558.4 | 7942195 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-4 | 427548 | 7941766 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-5 | 428042.8 | 7941738 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-6 | 428519.7 | 7941699 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-7 | 427502.4 | 7941278 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-8 | 428010.9 | 7941222 |
| Foz do Rio São Mateus | LTC2-9 | 428516.4 | 7941197 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-1 | 449049.4 | 7999258 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-2 | 449471.8 | 7999498 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-3 | 449935.9 | 7999704 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-4 | 449291.6 | 7998833 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-5 | 449731.9 | 7999071 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-6 | 450197.4 | 7999299 |

| | | | |
|-------------------|--------|----------|---------|
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-7 | 449580.4 | 7998411 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-8 | 450010.2 | 7998644 |
| Foz do Rio Mucuri | LTC3-9 | 450455 | 7998893 |

Quadro 36: Pontos de amostragem de recrutamento de pós-larvas recifais (Anexo 7) no sul da Bahia.

| Zona | Ponto | Coordenadas UTM - 24K | |
|-------------------------|---------|-----------------------|---------|
| | | X | Y |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-1 | 530704 | 8012777 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-2 | 531022 | 8012998 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-3 | 531241 | 8013291 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-4 | 531339 | 8012223 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-5 | 531762 | 8012222 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-6 | 532080 | 8012222 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-7 | 531648 | 8013531 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-8 | 532061 | 8013462 |
| Arquipélago de Abrolhos | ABRLT-9 | 532539 | 8013461 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-1 | 534054 | 8012912 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-2 | 533928 | 8012497 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-3 | 534124 | 8012288 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-4 | 534210 | 8013192 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-5 | 534261 | 8013407 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-6 | 534359 | 8013660 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-7 | 534529 | 8013872 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-8 | 534811 | 8013941 |
| Parcel de abrolhos | PABLT-9 | 535144 | 8013817 |
| RESEX Cassurubá | CALT-1 | 474771 | 8012988 |
| RESEX Cassurubá | CALT-2 | 474794 | 8012352 |
| RESEX Cassurubá | CALT-3 | 474723 | 8011755 |
| RESEX Cassurubá | CALT-4 | 475143 | 8011324 |
| RESEX Cassurubá | CALT-5 | 475587 | 8010887 |
| RESEX Cassurubá | CALT-6 | 476527 | 8012349 |
| RESEX Cassurubá | CALT-7 | 477138 | 8011870 |
| RESEX Cassurubá | CALT-8 | 477679 | 8011629 |
| RESEX Cassurubá | CALT-9 | 478291 | 8011543 |
| Parcel das Paredes | PPLT-1 | 503224 | 8044289 |
| Parcel das Paredes | PPLT-2 | 502751 | 8044611 |
| Parcel das Paredes | PPLT-3 | 503812 | 8044059 |
| Parcel das Paredes | PPLT-4 | 504238 | 8043600 |
| Parcel das Paredes | PPLT-5 | 504410 | 8042946 |
| Parcel das Paredes | PPLT-6 | 505031 | 8042628 |
| Parcel das Paredes | PPLT-7 | 505544 | 8041332 |
| Parcel das Paredes | PPLT-8 | 504996 | 8041946 |
| Parcel das Paredes | PPLT-9 | 505234 | 8040719 |

No momento da instalação e da retirada das armadilhas foram anotados profundidade e horário (instalação e retirada), além de dados oceanográficos e variáveis ambientais mensurados por uma sonda Multi-Parâmetro. As seguintes variáveis ambientais foram coletadas *in situ* utilizando-se sonda multiparâmetros devidamente calibrada: Temperatura (°C), salinidade, pH, Oxigênio Dissolvido (OD, %), turbidez (NTU) e profundidade (m). Os dados de altura de ondas, direção e intensidade do vento foram extraídos do site do Centro de Previsão de tempo e Estudos Climáticos (CPTEC: www.cptec.inpe.br) e Surf guru (www.surfguru.com.br).

Após 12 horas de imersão, as armadilhas serão retiradas cuidadosamente com o auxílio de um croque náutico. As amostras coletadas serão colocadas em recipientes com anestésico benzocaína visando eutanásia. Após, serão transferidas para potes (devidamente etiquetados com informações sobre a data, hora e local da coleta) de polietileno de 500 mL contendo álcool 70% para a sua preservação (Félix-Hackradt, 2013). Os potes serão armazenados em caixas organizadoras, que também serão rotuladas com a data, hora e local da coleta. Em todas as coletas, serão monitoradas *in situ* as variáveis ambientais descritas anteriormente.

❖ Estudos de telemetria de peixes no estuário do Rio Doce e recifes adjacentes

- Área de estudo

Para os peixes estuarinos/marinhos serão instaladas duas malhas de receptores. O primeiro estará localizado ao longo do estuário do rio Doce e o segundo na região marinha adjacente.

O estudo de telemetria de peixes recifais foi realizado no arquipélago de Abrolhos, dentro do Parque Nacional Marinho de Abrolhos, em virtude da abundância do badejo quadrado, *Mycteroperca bonaci*, e principalmente devido à presença, já identificada, de que a lama de rejeitos da barragem alcançou a região, de forma que efeitos da mesma sobre o comportamento dos indivíduos podem ser investigados.

- Teste de alcance de detecção

Os estudos envolvendo telemetria foram realizados seguindo metodologia proposta por Hackradt (2012). O monitoramento dos indivíduos marcados foi realizado através de 2 abordagens: o monitoramento ativo (com o uso do VR100) e passivo (através da instalação de receptores fixos, VR2W).

Para o monitoramento ativo e passivo das marcas acústicas é necessário que se determine o alcance dos hidrofones móveis (VR100), e dos receptores fixos (VR2W) através da condução de uma prova de intervalo de detecção. Este teste foi realizado utilizando um tag (emissor) de referência, de intervalo de 10 segundos. Este foi disposto em um ponto fixo com auxílio de um fundeio e uma boia, de forma que a embarcação se afastava do mesmo a crescentes distâncias de

20, 40, 80, 160, 320 e 640 metros e com dois diferentes ganhos 6 e 48 dB, utilizando um hidrofone móvel (VR100) a bordo da embarcação para captar os sinais emitidos pelo tag de referência. Esses sinais foram recebidos durante um intervalo de 5 minutos em cada uma das distâncias e dos ganhos testados, até que a embarcação se movesse para uma nova posição. Quando a intensidade de recepção baixou a menos 60dB, ou não foram mais detectados sinais, determinou-se o alcance de detecção dos receptores fixos e do receptor movel para aquela localidade. Esse teste foi feito tanto no arquipélago dos Abrolhos como nas áreas estuarinas estudadas (Rio Doce e São Mateus). Essa distância foi utilizada na determinação das distâncias e locais de instalação dos receptores fixos (VR2W) em torno do arquipélago de Abrolhos e nos rios citados acima.

- Instalação do grid de detecção

Em cada área amostradas (Abrolhos, rio Doce e rio São Mateus), um conjunto de 8 receptores fixos, modelo VR2W, foram fixados em uma poita de aproximadamente 30kg cada. Um receptor por poita foi instalado com auxílio de abraçadeiras plásticas em um tubo de PVC cimentado na poita, e instaladas em substrato de areia em pontos estratégicos dos ambientes estudados.

A área de estudo e sua área de entorno foram monitoradas periodicamente através do uso de dois tipos distintos de hidrofones, um holo-direcional (VH165) e outro direcional (VH110), utilizados a partir da embarcação de monitoramento.

- Marcação dos indivíduos

Para captura dos peixes, foram utilizados covos, puçás, pesca subaquática com auxílio de linha e anzol sem morte (para as espécies recifais) e anestésicos para a captura de espécies que se refugiam em covas e grutas. Os peixes capturados foram levados ao barco, onde foram colocados em caixa térmica com água do mar aerada e anestesiados com benzocaína (50ppm) até atingirem o grau III de anestesia (IWANA et al. 1989). Após atingirem o estágio de anestesia adequado, cada indivíduo teve a bexiga natatória esvaziada com auxílio de agulha hipodérmica 20G para permitir a implantação do *tag* acústico. Em seguida o peixe é colocado na cama cirúrgica para mensuração (comprimento padrão e total) e inserção do *Tag* externo (modelo *dart tag*, Floytag®) inserido lateralmente no dorso de cada animal de forma a individualizá-lo e permitir o reconhecimento de um indivíduo marcado durante a imersão.

Para a cirurgia o peixe deve estar posicionado na cama cirúrgica com o ventre exposto. A ventilação foi mantida em todo momento através do uso de uma bomba conectada por mangueira a água do mar e posicionada na boca do indivíduo. Foi retirada uma escama da região entre as nadadeiras pélvicas e posteriormente foi realizada a assepsia da região com iodo, para que uma pequena incisão de 2 centímetros na cavidade peritoneal fosse feita. Uma *tag* esterilizada foi inserida através da incisão realizada e em seguida fechada com cola cirúrgica e auxílio de pinças, unindo ambas laterais da incisão. Após a cirurgia o peixe retornou para a caixa térmica contendo água do mar sem

anestésico, para sua recuperação, e após 5 minutos o peixe foi devolvido ao mesmo local da captura acompanhado pelos mergulhadores.

- Monitoramento acústico

O rastreamento acústico dos indivíduos marcados foi realizado de dois modos:

i) Passivo: Para a obtenção dos dados registrados nos receptores VR2W, visitas ao local de instalação do grid de detecção são realizadas a cada 3 meses para descarregar os dados dos receptores subaquáticos fixos. Para tal, um mergulhador recolhe os receptores e os leva a embarcação onde o mesmo é conectado ao computador através de bluetooth e o software VUE v 2.6.1 (Vemco ®) é utilizado para acessar os dados registrados e guardá-los. Um arquivo em excel é exportado para posterior análise de dados. Ao término da descarga os hidrofones foram re-ativados novamente para o modo gravação e foram devolvidos em suas posições iniciais.

ii) Ativo: O rastreamento ativo foi realizado utilizando-se um hidrofone direcional (VH110) e um holo-direcional (VH165) que foi acoplado a um localizador receptor VR100 (VEMCO). Transectos de 10 minutos em cada local de marcação foram realizados. Quando nenhum peixe foi detectado, outro local era visitado. Quando havia sinal positivo, o barco era posicionado para adquirir o sinal mais forte possível (minimamente 60dB) a partir do transmissor e seguir o sinal detectável. Quando o sinal era perdido, o transecto continuava até os 10 minutos estarem completos. Quando um novo sinal era detectado pelo receptor móvel, se prosseguia para completar o rastreamento com este novo peixe. O rastreamento foi feito até que o sinal do animal era perdido. Ao término do dia de monitoramento, os dados eram descarregados e exportados utilizando o VR100 Host Software v.3.5.0 (Vemco®).

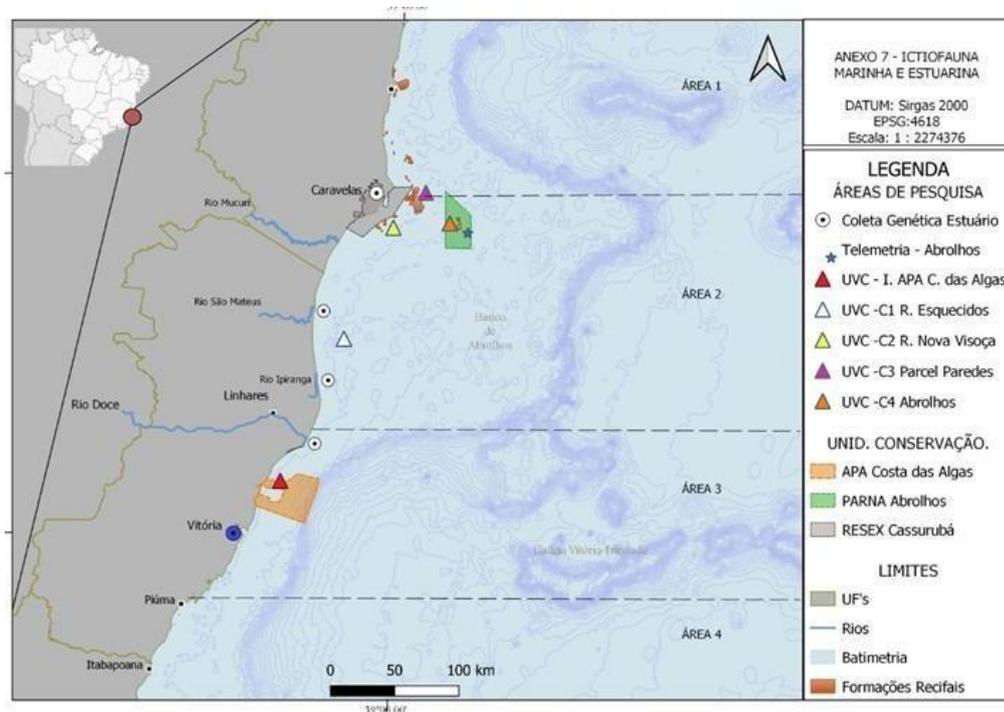
❖ Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

- Genética de populações

As amostragens de peixes recifais são realizadas por meio de visitas a desembarques pesqueiros do estado do Espírito Santo em colaboração com a equipe do GEF Mar -ICMBio (ES) e na cidade de Porto Seguro – BA, para obtenção de amostras provenientes de embarcações de pesca de espinhel de fundo, que atuam entre o sul da Bahia e norte do Rio de Janeiro. Os organismos amostrados são separados por agrupamentos amostrais compondo populações hipotéticas estabelecidas de acordo com a proximidade geográfica, identificadas como áreas: A1 -Norte de Abrolhos e Royal Charlotte, A2 - Sul do banco de Abrolhos, A3 - Plataforma estreita entre Linhares e Piúma, A4- Marataízes e norte do RJ (com pontos 8 de monitoramento: Portos de Vila Velha (V), Anchieta (A), Marataízes (M), Santa Cruz (S), Guarapari (G), Piúma (P), Itaipava (I) e Porto Seguro - BA (PP). Enquanto as amostras de peixes estuarinos estão sendo coletados concomitantemente com as campanhas do anexo 7 – UFES direcionadas à pesca. Para as espécies estuarinas o

agrupamento amostral foi realizado conforme o rio de coleta: 1- Rio Caravelas, 2- Rio Doce, 3- Rio Ipiranga e 4-Rio São Mateus (Figura 59).

Figura 59: Mapa da amostragem nas áreas recifais e estuarinas para a obtenção de amostras de tecido para estudo de diversidade genética em 15 espécies de peixes



Os fragmentos de tecido obtidos ao longo das coletas foram armazenados em criotubos com etanol 95%, e mantidos em temperatura de -80°C , no intuito de garantir a conservação do material genético para análises posteriores.

Cabe ressaltar que os tecidos de peixes recifais e/ou estuarinos coletados são oriundos da nadadeira caudal ou anal, para não danificar o pescado, que posteriormente será vendido a população da região ou exportado para outros países. No caso dos peixes recifais, o ambiente de coleta - desembarques pesqueiros - requer agilidade na obtenção das amostras e manuseio do pescado, impossibilitando a obtenção de fotos individuais e identificadas dos organismos amostrados. Já no caso dos peixes estuarinos, os tecidos são oriundos dos peixes coletados pela equipe do CEUNES, sendo o Laboratório de Genética e Conservação Animal, responsável pela sua retirada, acondicionamento e envio para a UFSB, em Porto Seguro. São coletadas em média 40 amostras de cada espécie por localidade, mesmo que o número amostral citado no protocolo para análises de genética populacional seja de 30. Tomamos essa medida na tentativa de manter organismos extras para utilização caso problemas com a extração e amplificação de amostras ocorra.

As amostras foram armazenadas em microtubos plásticos contendo etanol 95% e mantidas refrigeradas até o momento do processamento, quando serão submetidas aos procedimentos de extração e amplificação do DNA no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFSB.

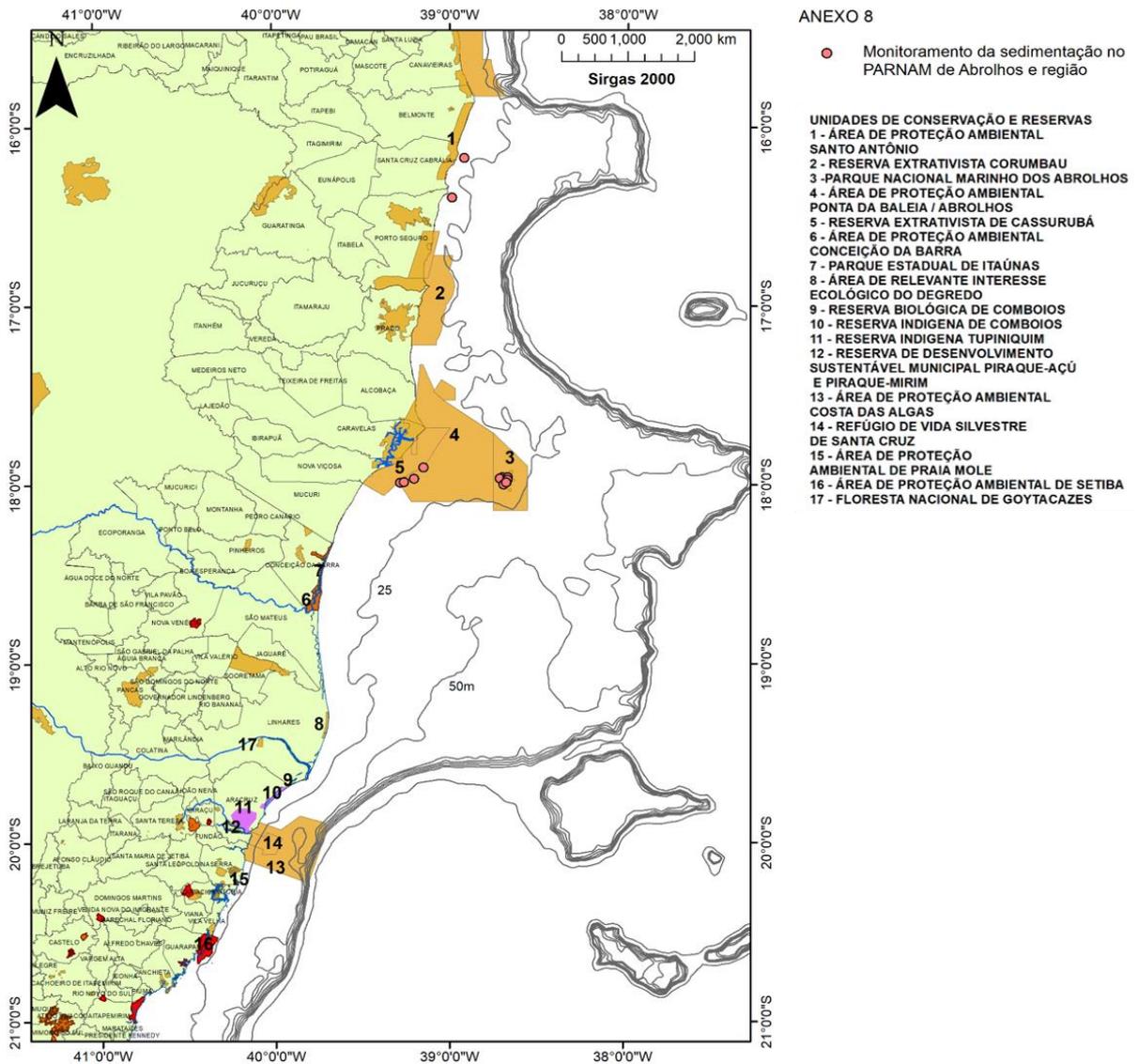
- DNA mitocondrial (Barcoding)

Para os estudos de DNA mitocondrial Barcoding, porções dos músculos e/ou nadadeiras de 5 exemplares (quando possível) de cada espécie serão removidas, armazenadas em frascos plásticos com álcool 96%, e mantidas congeladas até o processamento. Este procedimento será realizado para todas as espécies coletadas. A não ser que não se tenha acesso ao peixe todo, este procedimento será realizado no laboratório.

5.8 ANEXO 8. MONITORAMENTO DA SEDIMENTAÇÃO NO PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS E REGIÕES RELACIONADAS

O Anexo 8 trata do monitoramento oceânico para a região do Parque Nacional (PARNA) dos Abrolhos em vista de sua importância ecológica e do risco potencial dos rejeitos provenientes do rompimento da Barragem de Fundão no arquipélago dos Abrolhos (Figura 60). Em etapa inicial, este monitoramento é proposto para acontecer em duas partes: (1) buscar uma calibração para imagens de satélite (Landsat, Sentinel e MODIS Terra 220 m) para o parâmetro MPS (Material Particulado em Suspensão) e gerar mapas que mostrem a evolução temporal deste parâmetro em Abrolhos; (2) monitorar, em caráter sazonal, o material particulado em suspensão (MPS) no mar e a sedimentação na região, visando determinar a assinatura geoquímica do material aportado ou ressuspensionado.

Figura 60. Malha amostral de armadilhas de sedimento Anexo 8 – Abrolhos



A partir das amostras coletadas em campo, serão empregadas estratégia de trabalho e uso de ferramentas complementares ao sensoriamento remoto, tais como: (1) a técnica de assinatura isotópica baseada nas razões dos isótopos radiogênicos de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$; (2) a análise da quantidade de Fe e Mn na presente na água; (3) na análise elementar (Si, Al, Fe, Ti, Ca, Cl, Zn, Cu, K, Mg e Na) de partículas por EDS; e (4) na análise gravimétrica do material particulado suspenso (MPS) total na superfície do oceano. Também foram realizadas coletas das características da coluna d'água do mar nos pontos amostrados (reflectância e profundidade de Secchi).

5.8.1 Aspectos do monitoramento

As estações de amostragem foram definidas anteriormente, visando detalhamento das análises geoquímica, análise de micropartículas e de isótopos radiogênicos. Vale lembrar que em tais pontos deverão ser instaladas armadilhas de sedimento em 6 pontos do arquipélago dos Abrolhos (Tabela 17) para serem realizadas as análises de isótopos radiogênicos. As armadilhas deverão ser trocadas para cada estação do ano. Além disso, deve-se instalar uma roseta de garrafas de coletas (Ponto Chapeirão do Pierre) que permitirão amostragem mensal, as quais deverão ser trocadas anualmente. A Figura 61 e a Tabela 17 indicam esses pontos e suas coordenadas, como previsto no Plano de Trabalho do Anexo 8.

Figura 61: Região de amostragem do Anexo 8 para Abrolhos.

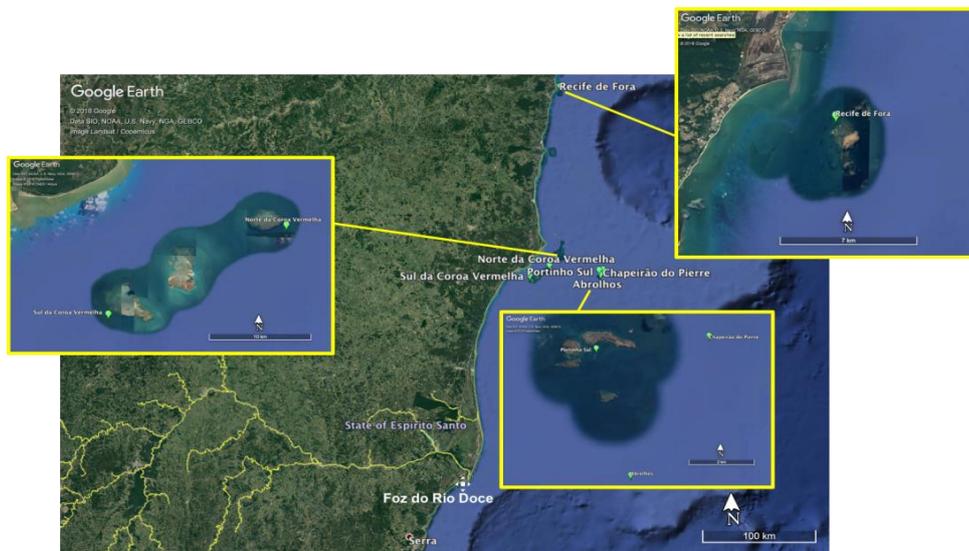


Tabela 17: Sítios de monitoramento da sedimentação no PARNA de Abrolhos e região adjacente.

| Pontos de Amostragem | Coordenadas UTM (datum SIRGAS2000) | |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| | E | S |
| Arquipélago dos Abrolhos | | |
| 1. Portinho Sul | 531469.00 m E | 8013385.00 m S |
| Parcel dos Abrolhos | | |
| 2. Chapeirão do Pierre | 534920.00 m E | 8013852.00 m S |
| Parcel Coroa Vermelha | | |
| 3. Sul Coroa Vermelha | 471092.00 m E | 8008783.00 m S |
| 4. Norte Coroa Vermelha | 488385.00 m E | 8018396.00 m S |
| Sul do Arquipélago | | |
| 5. Abrolhos | 532581.00 m E | 8009234.00 m S |
| Pontos-controle | | |
| 6. Recife de Fora | 501511.00 m E | 8187064.00 m S |

Para aumentar o espaço amostral para os dados de calibração satelital, caso seja possível visualizar algum local com maior concentração de sedimentos em suspensão, a coleta é realizada nestas posições. Os pontos de amostragem são variáveis, sendo que os mesmos estão dentro da mesma região dos pontos já definidos.

5.8.2 Calibração usando filtragem de MPS e profundidade de Disco de Secchi

A coleta de água superficial será realizada com o uso de uma garrafa Van Dorn. Esse equipamento permite a coleta de amostras na superfície e em diferentes profundidades para estudo dos fatores abióticos. Para as amostras de Abrolhos, foi pré-definido um volume de amostra de 20 L, considerando o ineditismo da aplicação da técnica naquelas águas. Galões de plásticos de polipropileno (PP) foram previamente lavados com água do local de amostragem, onde foram estocadas as amostras coletadas. As coletas foram feitas a cerca de 0,4 m de profundidade com a garrafa de Van Dorn. Em alguns casos, os galões foram colocados diretamente dentro da água, na profundidade desejada e aguardou-se que a água os preenchesse completamente. Após serem colocados dentro da embarcação, os galões foram fechados com um plástico e fixados com fita adesiva. Assim como foram identificados e colocados à sombra.

Para auxiliar na medição de atenuação de luz na coluna d'água foi utilizado equipamento Disco de Secchi no mesmo ponto amostral. O Disco de Secchi é um disco circular de cor preto e branco, especialmente construído para estimar a transparência e o nível de turbidez de corpos hídricos. Geralmente o disco tem 20 ou 30 cm de diâmetro, e é baixado verticalmente na água por meio e

uma corda náutica, aos poucos, até desaparecer. O objetivo é registrar precisamente a profundidade na qual o padrão gráfico do disco não pode mais ser detectado a olho nu. A medida dessa profundidade pode ser usada para estimar a atenuação média da luz na coluna de água, sendo denominada profundidade de Secchi. Quanto mais ricas em microorganismos ou partículas de sedimento suspensa na água, o disco de Secchi pode desaparecer da vista em profundidades pequenas. Em todas os pontos de coleta antes de se iniciar as amostragens serão medidos a profundidade da camada de atenuação de Luz com o uso de um disco de Secchi. Nas amostras de água coletadas, serão medidos o pH e a Temperatura da mesma a partir de um medidor portátil.

5.8.3 Calibração satelital usando o espectroradiômetro

O espectroradiômetro FieldSpec®HandHeld2™ será utilizado para a coleta das características espectrais da água do mar nos locais amostrados. Através das assinaturas espectrais da coluna d'água é possível identificar como a coloração varia, em diferentes comprimentos de onda, devido a concentração do MPS. Esta informação é de grande valia para a calibração das imagens e da construção de um algoritmo empírico, principalmente para as estimativas de MPS através das imagens de satélite.

Todas as coletas serão realizadas com a mesma geometria de aquisição, ângulo zenital de 45° e ângulo azimutal solar de 135°, em cada ponto amostral. As medições atmosféricas e da placa de calibração também serão realizadas em cada ponto amostral, respeitando as mesmas geometrias de aquisição. Estas duas últimas medições são utilizadas para a correção dos dados medidos para a superfície do mar.

5.8.4 Amostragens para análise de MPS

A amostragem para as análises de Sr/Nd e amostragem para análises de microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) ocorrem da mesma maneira que a coleta de MPS para calibração satelital. Porém, os filtros utilizados nestas etapas são filtros de policarbonato de 47 mm de diâmetro e com 0,4µm de porosidade.

5.8.5 Razão elementar Fe:Mn como marcador da concentração/dispersão da lama de minério da Samarco em abrolhos

A razão elementar de Fe:Mn foi escolhida por se tratar dos elementos majoritários presentes no minério da Samarco (com exceção do Si) e por terem padrões de solubilidade diferenciados. Estes dados possibilitaram uma comparação direta com as medidas deste mesmo parâmetro realizadas pela CPRM no Rio Doce antes e após o acidente de Mariana. O resultado da comparação evidenciará se as razões Fe:Mn para a lama de minério da Samarco é significativamente menor ou

maior do que as razões dos sedimentos em Abrolhos. Desta forma, esta razão mostra-se potencialmente boa para dar continuidade ao monitoramento em Abrolhos.

Para as amostras de Abrolhos, foi pré-definido um volume de amostra de 5L de água do mar, no sentido de se garantir a detectabilidade necessária à técnica de composição elementar (e também dos isótopos radiogênicos, principalmente os isótopos de Nd). Galões plásticos de polipropileno (PP) foram previamente lavados com água miliQ em laboratório e rinsados no local de amostragem com água do mar. Nos locais estabelecidos para a amostragem, as coletas foram realizadas a cerca de 0,4 m de profundidade. Após serem colocados dentro da embarcação, os galões foram lacrados e identificados. O processo de filtragem ocorreu da mesma maneira que as demais filtrações citadas acima.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [Abnt] Associação Brasileira De Normas Técnicas. 2015. - Ecotoxicologia - Coleta, Preservação E Preparo De Amostras. Abnt Nbr 15469, Segunda Edição, 16.12.2015.
- Am, N.F.Y., Wong, Y.S. Spatial Variation Of Heavy Metals In Surface Sediments Of Hong Kong Mangrove Swamps. *Environmental Pollution*, 110:195-205, 2000.
- Anderson Mj, Gorley Rn, Clarke Kr 2008 *Permanova For Primer: Guide To Software And Statistical Methods*. Primer-E, Plymouth.
- Apg Iv - The Angiosperm Phylogeny Group, An Update Of The Angiosperm Phylogeny Group Classification For The Orders And Families Of Flowering Plants: Apg Iv. *Botanical Journal Of The Linnean Society*, 2016, 181, 1–20.
- Apha (2000). *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*. Washington, D.C., American Public Health Association.
- Araújo, M.S.L.C., Tenório, D.O., Castiglioni, D.S. Diversidade E Distribuição Dos Crustacea Brachyura Dos Manguezais Dos Rios Ariquindá E Mamucabas, Litoral Sul De Pernambuco, Brasil. *Revista De Gestão Costeira Integrada*, Lisboa, V. 14, N. 3. 2014.
- Buckland St, Anderson Dr, Burnham Kp, Laake JI, Borchers DI, Thomas L (2001) *Introduction To Distance Sampling: Estimating Abundance Of Biological Populations*. Oxford University Press, Oxford, Uk.
- Azevedo, A. F., A. M. Oliveira, S. C. Viana E M. Van Sluys. 2007. Habitat Use By Marine Tucuxis (*Sotalia Guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) In Guanabara Bay, South-Eastern Brazil. *Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom* 87:201-205.
- Brendel O, Losetta Ppmg, Stewart D. A Rapid And Simple Method To Isolate Pure Alpha Cellulose. *Phytochemistry Annal*, V. 17, P. 7-10, 2000.
- Brower, J.E., Zar, J.H. 1984. *Field & Laboratory Methods For General Ecology*. 2nd Ed. Brown Publishers, Boston. 226p.
- Brummitt, R.K., Powell, C.E. (Eds.). 1992. *Authors Of Plant Names*. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Buckland, S.T.; Anderson, D.R.; Burnham, K.P.; Laake, J.L.; Borchers, D.L. & Thomas, L. 2001. *Introduction To Distance Sampling*. Oxford University. Press, Oxford.
- Bugoni, L, McGill, Rar, Furness, Rw (2008) Effects Of Preservation Methods On Stable Isotope Signatures In Bird Tissues. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, V. 22, P. 2457-2462.
- Bugoni, L; Furness, Rw (2009) Age Composition And Sexual Size Dimorphism Of Albatrosses And Petrels Off Brazil. *Marine Ornithology*, V. 37, P. 249-252.

Catalán, I. A., Dunand, A., Álvarez, I., Alós, J., Colinas, N. Nash, R. (2014) An Evaluation Of Sampling Methodology For Assessing Settlement Of Temperate Fish In Seagrass Meadows. *Mediterranean Marine Science* 15/2, 338-349.

Clarke Kr 1993 Non-Parametric Multivariate Analyses Of Changes In Community Structure. *Austr J Ecol* 18:117–143.

Clarke Kr, Ainsworth M 1993 A Method Of Linking Multivariate Community Structure To Environmental Variables. *Mar Ecol Prog Ser* 92:205–219.

Campos, A.A.V., Costa, B.V.M., Yogui, G.T. Determinação Gravimétrica Do Teor De Carbonato De Cálcio Em Amostras De Solo E Sedimentos. Procedimento Operacional Padrão Organomar-2017-01, Revisão N° 1. Laboratório De Compostos Orgânicos Em Ecossistemas Costeiros E Marinhos, Departamento De Oceanografia, Universidade Federal De Pernambuco. 11p.

Carmo, D.L., Silva, C.A. Métodos De Quantificação De Carbono E Matéria Orgânica Em Resíduos Orgânicos. *Revista Brasileira De Ciências Do Solo*, 36:1211-1220, 2012.

Cassol, D., Silva, F. S. P., Falqueto, A. R., Bacarin, M.A., 2008. An Evaluation Of Non-Destructive Methods To Estimate Total Chlorophyll Content. *Photosynth.* 46 (4), 634-636.

Cavatte, P. C., Oliveira, A. A. G., Morais, L. E., Martins, S. C. V., Sanglard, L. M.V. P., Damatta, F. M. Could Shading Reduce The Negative Impacts Of Drought On Coffee? A Morphophysiological Analysis. *Physiol Plant.*, V.144, P.111–122, 2012a.

Cavatte, P. C., Rodríguez-López, N. F., Martins, S. C. V., Mattos, M. S., Sanglard, L. M. V. P., Damatta, F. M. Functional Analysis Of The Relative Growth Rate, Chemical Composition, Construction And Maintenance Costs, And The Payback Time Of *Coffea Arabica* L. Leaves In Response To Light And Water Availability. *J. Exp. Bot.*, V.63, P.3071–3082, 2012b.

Cintrón, G. & Schaeffer-Novelli, Y., 1984, Methods For Studying Mangrove Structure, Pp. 91-113. In: S. C. Snedaker & J. G. Snedaker (Eds.), *The Mangrove Ecosystem: Research Methods*, Unesco, Bungalow, United Kingdom, 251p.

Clinebell, R.R., Phillips, O.L., Gentry, A.H., Stark, N., Zuuring, H. 1995. Prediction Of Neotropical Tree And Liana Species Richness From Soil And Climatic Data. *Biodiversity And Conservation*, 4:56-90.

Dos Anjos, L., Oliva, M. A., Kuki, K. N. Fluorescence Imaging Of Light Acclimation Of Brazilian Atlantic Forest Tree Species. *Photosynthetica*, V.50, N.1, P.95-108, 2012.

Conama - Conselho Nacional Do Meio Ambiente. 2005. Resolução N° 357, De 17 De Março De 2005.

Dancy, Cristine P., Reidy, John. *Estatística Sem Matemática Para Psicologia*. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Daura-Jorge, F. G., L. L. Wedekin, V. Q. Piacentini E P. C. Simões-Lopes. 2005. Seasonal And Daily Patterns Of Group Size, Cohesion And Activity Of The Estuarine Dolphin, *Sotalia Guianensis* (P.J. Van Bénéden) (Cetacea, Delphinidae), In Southern Brazil. *Revista Brasileira De Zoologia* 22:1014-1021.

Fiori *Et.Al.* 2017. The Use Of Unmanned Aerial Systems In Marine Mammal Research. *Remote Sensing*. 09-00543-V2. Pdf.

De Grisse, A.T. 1969 Redescription Ou Modification De Quelques Techniques Utilisée Dans L'étude Des Nematodes Phytoparasitaires. *Mededelingen Rijksfaculteti Der Landbouveten Gent*: 351–369.

Diele, Karen. Life History And Population Structure Of The Exploited Mangrove Crab *Ucides Cordatus Cordatus* (L.)(Decapoda: Brachyura) In The Caeté Estuary, North Brazil. 2000. Tese De Doutorado. Zentrum Für Marine Tropenökologie.

Dos Santos Wd, Ferrarese MI, Nakamura Cv, Mourão Ksm, Mangolin Ca, Ferrarese-Filho O. Soybean (*Glycine Max*) Root Lignification Induced By Ferulic Acid: The Possible Mode Of Action. *Journal Of Chemical Ecology*, V. 34, P. 1230-124. 2008.

Dutra, V. F., Alves-Araújo, A., Carrijo, T. T. 2015. Angiosperm Checklist Of Espírito Santo: Using Electronic Tools To Improve The Knowledge Of An Atlantic Forest Biodiversity Hotspot. *Rodriguésia* 66 (4): 1145-1152.

Ecocean. Care® (Collection By Artificial Reef-Ecofriendly) Breveté Par Ecocean, Guide De Montage Et D'utilisation. Disponible Em [Www.Ecocean.Fr](http://www.ecocean.fr) , Acesso Em: 05/09/2018.

Falqueto, A.R., Silva, D.M., Fontes, R.V. Photosynthetic Performance Of Mangroves *Rhizophora Mangle* And *Laguncularia Racemosa* Under Field Conditions. *Revista Árvore*, V.32, N.3, P.577-582, 2008.

Félix-Hackradt, F.C., Hackradt, C.W., Treviño-Otón, J., Segovia-Viadero, M., Pérez-Ruzafa A. García-Charton, J.A. (2013). Environmental Determinants On Fish Post-Larval Distribution In Coastal Areas Of South-Western Mediterranean Sea. *Estuarine, Coastal And Shelf Science* 129, 59e72.

Fernie Ar, Roscher A, Ratcliffe Rg, Kruger Nj (2001) Fructose 2, 6-Bisphosphate Activates Pyrophosphate: Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase And Increases Triose Phosphate To Hexose Phosphate Cycling In Heterotrophic Cells. *Planta* 212: 250-263

Fernie, A.R., Aharoni, A., Willmitzer, L., Stitt, M., Tohge, T., Kopka, J., Carroll, A.J., Saito, K., Fraser, P.D., Deluca, V. Recommendations For Reporting Metabolite Data. *Plantcell*, V.23, P.2477-2482, 2011.

Fidalgo, O., Bononi, V. L. R. 1989. Técnicas De Coleta, Preservação E Herborização Do Material Botânico. São Paulo: Instituto De Botânica, Flora Do Brasil 2020 (Em Construção). Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. Disponível Em: < [Http://Floradobrasil.Jbrj.Gov.Br/](http://Floradobrasil.Jbrj.Gov.Br/) >.

Filizola, H.F., Gomes, M.A.F., Souza, M.D. De S. Manual De Procedimentos De Coleta De Amostras Em Áreas Agrícolas Para Análise Da Qualidade Ambiental: Solo, Água E Sedimentos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 169p.

Gallon, C. Z., Fuller, S. C., Fanning, K., Smyth, H. E., Pun, S., Martin, I. F., O'hare, T. J. Increase In: Ionone, A Carotenoid-Derived Volatile In Zeaxanthin Biofortified Sweet Corn. J Agric Food Chem, 61, 7181-7187, 2013.

Gentry, A.H. 1991. The Distribution And Evolution Of Climbing Plants. Pp. 3-53. In: F.E. Putz., H.A. Mooney. The Biology Of Vines. Cambridge, Cambridge University Press.

Gibon Y, Blaesing Oe, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks Jh, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A Robot-Based Platform To Measure Multiple Enzyme Activities In Arabidopsis Using A Set Of Cycling Assays: Comparison Of Changes Of Enzyme Activities And Transcript Levels During Diurnal Cycles And In Prolonged Darkness. The Plant Cell Online 16: 3304-3325

Giulietti, A.M., Rapini, A., Andrade, M.J.G., Queiroz, L.P., Silva, J.M.C. (Org.) 2009. Plantas Raras Do Brasil. Conservação Internacional, Belo Horizonte.

Guia Brasileiro De Boas Práticas Em Eutanásia Em Animais - Conceitos E Procedimentos Recomendados - Brasília, 2012 1v. (62p).

Guidi, L., Calatayud, A. Non-Invasive Tools To Estimate Stress-Induced Changes In Photosynthetic Performance In Plants Inhabiting Mediterranean Areas. Environ. Exp. Bot. (2014), [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Envexpbot](http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot).

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. The Water-Culture Method For Growing Plants Without Soil. California Agricultural Experiment Station, Circular-347. 1950

Hackradt, C.W. (2012). Population Ecology And Mobility Patterns Of Groupers (Serranidae: Epinephelinae) On Temperate Rocky Reefs On South-Western Mediterranean Sea: Implications For Their Conservation. (Tese De Doutorado) – Departamento De Ecologia E Hidrologia, Universidade De Murcia, Murcia. 160 Pp.

Higgins, M.A., Ruokolainen, K. (2004) Rapid Tropical Forest Inventory: A Comparison Of Techniques Based On Inventory Data From Western Amazonia. Conservation Biology, 18, 799–811.

Iucn 2011. Iucn Red List Of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível Em <[Www.Iucnredlist.Org](http://www.iucnredlist.org)> .

Lichtenthaler, H. K. Chlorophyll And Carotenoids: Pigments Of Photosynthetic Biomembranes. Methods In Enzymology, V.148, P.349-382, 1987.

- Hodgson Et. Al. 2017. Unmanned Aerial Vehicles For Surveying Marine Fauna: Assessing Detection Probability. *Ecological Applications*, 27(4): 1253–1267.
- Jones, T.C, Hunt, R.D., King, N.W. (1997) *Veterinary Patology*. Baltimore-Usa. 6a Ed. Williams & Wilkins. 1392p.
- Kramer, K. J. M., Brockmann, U. W. & Warwick, R. M. (1994). *Tidal Estuaries: Manual Sampling And Analytical Procedures*. Rotterdam, A.A. Balkema Publishers. 304p.
- Krauss, K.W., Lovelock, C.E., Mckee, K.L., López-Hoffman, L., Ewe, S.M.L., Sousa, W.P. *Environmental Drivers In Mangrove Establishment And Early Development: A Review*. *Aquatic Botany*, Amsterdam, V. 89, P.105–127, 2008.
- Lana, P. Da C.; Bianchini, A.; Ribeiro, C.A. De O.; Nienchsecki, L.F.H.; Fillmann, G. & Santos, C.S.G. (Orgs.). (2006). *Avaliação Ambiental De Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas*. Rio De Janeiro, Museu Nacional, 156p.
- Leal, Gr, Furness, Rw, Mcgill, Rar, Santos, Ra, Bugoni, L (2017) *Feeding And Foraging Ecology Of Trindade Petrels Pterodroma Arminjoniana During The Breeding Period In The South Atlantic Ocean*. *Marine Biology*, V. 164, P. 211.
- Lecaillon, G. (2004). The "Care" System As A Method Of Producing Farmed Marine Animals For The Aquarium Market: An Alternative Solution To Collection In The Wild. *Spc Bulletin*, 12.
- Luque, R., Sousa, H. C.; Kraus, J. E. *Métodos De Coloração De Roeser (1972) Modificado E Kropp (1972) Visando A Substituição Do Azul De Astra Pelo Azul De Alcção 8gs Ou 8gx*. *Acta Botanica Brasilica*, V. 10, N. 2, P. 199-212, 1996.
- Macia, A. Et Al. *Hydrobiologia*, Dordrecht, V. 449, P. 213-219. 2001.
- Mackey, A.P., Hodgkinsom, M.C. *Concentrations And Spatial Distribution Of Trace Metals In Mangrove Sediments From The Brisbane River, Australia*. *Environmental Pollution*, 90(2):181-186, 1995.
- Marsh, H. & Sinclair, D.F. 1989. *Correcting For Visibility Bias In Strip Transect Aerial Surveys Of Aquatic Fauna*. *Journal Of Wildlife Management*, 53(4): 1017- 1024.
- Martinelli, G., Moraes, M.A. 2013. *Livro Vermelho Da Flora Do Brasil*. Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. Disponível Em: [Http://Cncflora.Jbrj.Gov.Br](http://Cncflora.Jbrj.Gov.Br).
- Masunari, Setuko. *Distribuição E Abundância Dos Caranguejos Uca Leach (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) Na Baía De Guaratuba, Paraná, Brasil*. *Revista Brasileira De Zoologia*, Curitiba, V. 23, N. 4. 2006.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. *Chlorophyll Fluorescence – A Practical Guide*. *Journal Of Experimental Botany*, V. 51, N. 345, P. 659 – 668, 2000.

Medeiros, T. N. (2005). Uso Comparativo De Atrator Luminoso E Rede De Arrasto Na Captura De Larvas De Peixes No Estuário Do Rio Formoso – Pernambuco – Brasil (Dissertação). Universidade Federal Rural De Pernambuco, Recife, 60 Pp.

Minte-Vera, C.V., Moura, R.L., Francini-Filho, R. (2008). Nested Sampling: An Improved Visual-Census Technique For Studying Reef Fish Assemblages. *Marine Ecology Progress Series* 367:283-293

Mueller-Dombois, D., Ellenberg, H. 1974. *Aims And Methods Of Vegetation Ecology*. John Wiley & Sons, New York. 547p.

National Academies Of Sciences, Engineering, And Medicine. 2017. *Effective Monitoring To Evaluate Ecological Restoration In The Gulf Of Mexico*. Washington, Dc: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/23476>

Nowacek Et. Al. 2016. Studying Cetacean Behaviour: New Technological Approaches And Conservation Applications. *Animal Behaviour*. 120:235-244.

Nessimian, J.L.; Venticinque, E.M.; Zuanon, J.; De Marco Jr., P.; Gordo, M.; Fidelis, L.; Batista, J.D.; Juen, L. 2008. Land Use, Habitat Integrity, And Aquatic Insect Assemblages In Central Amazonian Streams. *Hydrobiologia*, 614: 117-131.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe Rg, Sweetlove Lj, Fernie Ar (2007) Deficiency Of Mitochondrial Fumarase Activity In Tomato Plants Impairs Photosynthesis Via An Effect On Stomatal Function. *The Plant Journal* 50: 1093-1106

Patrick Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A Pfaller. 2017. *Microbiologia Médica - 8ª Ed.* Elsevier. 888p

Peixoto, A.L., Gentry, A. 1990. Diversidade E Composição Florística Da Mata De Tabuleiro Na Reserva Florestal De Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Revista Brasileira De Botânica* 13: 19-25.

Phillips, O. L., J. S. Miller. 2002. *Global Patterns Of Plant Diversity: Alwyn H. Gentry's Forest Transect Data Set*. St. Louis, Missouri, Missouri Botanical Garden Press.

Pinheiro, Flávia. 2014. *Padrões De Uso De Habitat Do Boto-Cinza (Sotalia Guianensis) Na Região Da Foz Do Rio Doce, Costa Norte Do Espírito Santo, Sudeste Do Brasil*. Dissertação De Mestrado. Universidade Federal Do Espírito Santo. 40p.

Pontalti, Mônica. 2017. *Avaliação Do Uso De Vant Para A Coleta De Dados De Encalhes De Tetrápodes Marinhos Em Programas De Monitoramento De Praia*. Dissertação De Mestrado. Universidade Do Vale Do Itajaí. 66p.

Porra R, Thompson W, Kriedemann P (1989) Determination Of Accurate Extinction Coefficients And Simultaneous Equations For Assaying Chlorophylls A And B Extracted With Four Different Solvents:

Verification Of The Concentration Of Chlorophyll Standards By Atomic Absorption Spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)-Bioenergetics* 975: 384-394

Santos, M. R. De D. Parâmetros Bioquímicos, Hematócrito E Condição Corporal No Monitoramento Da Saúde De Tartarugas Marinhas *Chelonia Mydas* (Linnaeus, 1758) Juvenis Selvagens No Espírito Santo, Brasil. 2005. Universidade Federal Do Espírito Santo, 2005.

Schmidt, Anders Jensen Et Al. Estudo Comparativo Da Dinâmica Populacional De Caranguejo-Uçá, *Ucides Cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea-Decapoda-Brachyura), Em Áreas Afetadas E Não Afetadas Por Uma Mortalidade Em Massa No Sul Da Bahia, Brasil. *Bol. Téc. Cient. Cepene*, V. 17, N. 1, P. 41-64, 2009.

Schmidt, Anders Jensen Et Al. Relação Entre Abertura De Galeria E Comprimento De Cefalotórax Do Caranguejo-Uçá, *Ucides Cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustaceadecapoda-Brachyura). *Bol. Téc. Cient. Cepene*, V. 16, N. 1, P. 56-58, 2008b.

Schmidt, Anders Jensen; Theil, Cristina Maria Iepsen; Galli, Orlando Bastião Surlo. Estudos Preliminares Sobre Efeitos De Uma Mortalidade Em Massa Em Uma População De Caranguejouçá, *Ucides Cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Caravelas (Bahia-Brasil)*. *Bol. Téc. Cient. Cepene*, V. 16, N. 1, P. 43-49, 2008a.

Shädel C, Blöchl A, Richter A, Hoch, G. Quantification And Monosaccharide Composition Of Hemicelluloses From Different Plant Functional Types. *Plant Physiology And Biochemistry*, V. 48, P. 1-8, 2010.

Skov, M.W., Hartnoll R.G. Comparative Suitability Of Binocular Observation, Burrow Counting And Excavation For The Quantification Of The Mangrove Fiddler Crab *Uca Annulipes* (H. Milne Edwards). *Hydrobiologia*, Dordrecht, V. 449, P. 201- 212. 2001.

Silva, F. De A.S.E. & Azevedo, C.A.V. Principal Components Analysis In The Software Assistat-Statistical Attendance. In: *World Congress On Computers In Agriculture*, 7, Reno-Nv-Usa: American Society Of Agricultural And Biological Engineers. 2009.

Simonelli, M., Fraga, C. N. 2007. *Espécies Da Flora Ameaçadas De Extinção No Estado Do Espírito Santo*. Vitória: Ipema.

Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpel, E., Korall, P., Schneider, H., Wolf, P.G. 2006. A Classification For Extant Ferns. *Taxon* 55: 705-731.

Smith *Et.Al.* 2015. Assessment Of Known Impacts Of Unmanned Aerial Systems (Uas) On Marine Mammals: Data Gaps And Recommendations For Researchers In The United States. *Journal Of Unmanned Vehicle System*. In Press. Juvs-2015-0017.R1.

Sykora-Bodie *Et.Al.* 2017. Quantifying Nearshore Sea Turtle Densities: Applications Of Unmanned Aerial Systems For Population Assessments. *Nature*. 7: 17690. Doi: 10.1038/S41598-017-17719-X.

Sobrado, M.A. Leaf Characteristics And Gas Exchange Of The Mangrove *Laguncularia Racemosa* As Affected By Salinity. *Photosynthetica*, V. 43, N. 2, P. 217-221, 2005.

Strasser, B.J., Strasser, R.J. Measuring Fast Fluorescence Transients To Address Environmental Questions: The Jip-Test. In: P. Mathis, (Ed.) *Photosynthesis: From Light To Biosphere*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1995. Pp.977– 980.

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S., Goltsev, V. 2010. Simultaneous In Vivo Recording Of Prompt And Delayed Fluorescence And 820-Nm Reflection Changes During Drying And After Rehydration Of The Resurrection Plant *Haberlea Rhodopensis*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1797;1313–1326.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. The Fluorescence Transient As A Tool To Characterise And Screen Photosynthetic Samples. In: M. Yunus, U. Pathre, And P. Mohanty, Eds. (Eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation And Adaptation*. London:Taylor & Francis. V. 25, Pp. 443–480. 2000.

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava, A. Analysis Of The Fluorescence Transient. In: C. George C., C, Papageorgiou And C., Govindjee, (Eds.) *Chlorophyll Fluorescence: A Signature Of Photosynthesis*, Pp. 321-362. *Advances In Photosynthesis And Respiration Series*. Dordrecht.:Springer. 2004.

Sundaramanickam, A., Shanmugam, N., Cholan, S., Kumaresan, S., Madeswaran, P. Balasubramanian, T. Spatial Variability Of Heavy Metals In Estuarine, Mangrove And Coastal Ecosystems Along Parangipettai, Southeast Coast Of India. *Environmental Pollution*, 218:186-195, 2016.

Torres Lg, Nieu Kirk SI, Lemos L And Chandler Te. 2018. Drone Up! Quantifying Whale Behavior From A New Perspective Improves Observational Capacity. *Front. Mar. Sci.* 5:319.

Underwood, A.J. (1992). Beyond Baci: The Detection Of Environmental Impacts On Populations In The Real, But Variable, World. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology* 161, 2, 145-178.

U.S. Epa (2007) Method 3051a - Microwave Assisted Acid Digestion Of Sediments, Sludges, Soils, And Oils. 1–30.

Wetzel, R. G. & Likens, G. E. (2000). *Limnological Analysis*. 2nd Ed., New York, Springer-Verlag. 391.,

Wunderlich, A. C., Pinheiro, M. A. A. Mangrove Habitat Partitioning By *Ucides Cordatus* (Ucidae): Effects Of The Degree Of Tidal Flooding And Tree-Species Composition During Its Life Cycle. *Helgoland Marine Research*, V. 67, N. 2, P. 279, 2013.