

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade
Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2011/143730 A1

(43) Data de Publicação Internacional
24 de Novembro de 2011 (24.11.2011)

PCT

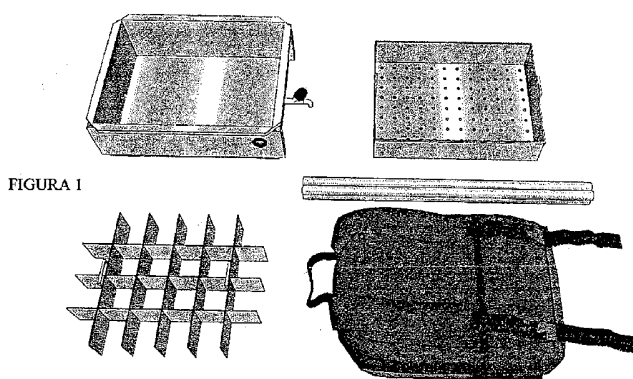
- (51) Classificação Internacional de Patentes :
A01M 23/02 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2011/000144
- (22) Data do Depósito Internacional :
18 de Maio de 2011 (18.05.2011)
- (25) Língua de Depósito Internacional :
Português
- (26) Língua de Publicação :
Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :
PII003910-4 19 de Maio de 2010 (19.05.2010) BR
- (71) Requerente (para todos os Estados designados, exceto US) : **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ** [BR/BR]; Avenida Brasil, Nº 4365, Manguinhos, Cep: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ (BR).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) : **BAPTISTA, Darcilio Fernandes** [BR/BR]; Av. Brasil 4365, Castelo Mourisco, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ (BR). **MUGNAI, Riccardo** [IT/BR]; Rua Riachuelo 244, apto. 1106, Centra, Rio de Janeiro, RJ (BR). **DE OLIVEIRA, Renata Bley** [BR/BR]; Av. Brasil 4365, Castelo Mourisco, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ (BR).
- (74) Mandatário : **DE ALMEIDA, Katia F.**; Bhering, Almeida & Associados, Rua Beneditinos 16, 11º andar, 20081-050 Rio de Janeiro - RJ (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

(54) Title : AQUATIC MACROINVERTEBRATE SUBSAMPLING EQUIPMENT

(54) Título : EQUIPAMENTO PARA SUBAMOSTRAGEM DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS



(57) Abstract : The present application aims at the performance of biomonitoring without requiring large sample volumes. Sampling in an aquatic environment is performed using an equipment comprising a tray provided with a tap and housing a perforated tray partitioned into 24 parts by a partitioning element. The equipment is positioned at the surface so as to allow the substrate to enter inside the tray, undesirable material is removed and excess water is drained before anesthetics are added and the contents are partitioned by the partitioning element. To end the process, the anesthetic solution is drained, and the substrates in the quadrats are collected and conditioned. The equipment may be optionally provided with legs.

(57) Resumo : O presente pedido tem o objetivo de fazer biomonitoramento sem utilizar grandes volumes de amostras. Utilizando equipamento composto por uma bandeja com torneira que abriga em seu interior uma bandeja perfurada dividida em 24 partes por uma peça divisora, é procedida amostragem em ambiente aquático. Posicionando o equipamento na superfície favorecendo a entrada do substrato no interior da bandeja, é retirado material indesejado e drenado o excesso de água antes da adição de anestésico e divisão do seu conteúdo por peça divisora. Finalizando o processo, é feita drenagem da solução anestésica seguido de coleta e acondicionamento dos substratos dispostos nos quadrats. Opcionalmente o equipamento pode ser equipado com pés.

WO 2011/143730 A1

EQUIPAMENTO PARA SUBAMOSTRAGEM DE MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS

Campo da Invenção

A presente invenção se refere ao subamostrador e a uma metodologia de subamostragem que possibilitam a realização de biomonitoramento ambiental sem o uso de grandes volumes de amostra, assegurando, no entanto, a riqueza de espécie e a rapidez na análise.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O monitoramento biológico é um componente central na gestão de recursos hídricos e para a conservação da integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos (Karr, J. R. 1991. Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. *Ecological Applications*, 1: 66-84.; Rosenberg, D.M. e Resh V.H. (Eds.). 1993. *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman and Hall (Eds.), New York, 488p.; Karr, J. R. e Chu, E. W.. 1999. *Restoring Life in Running Waters: Better Biological Monitoring*. Island Press, Washington, DC.).

Programas de monitoramento biológico dos ecossistemas aquáticos foram criados no início do século XX por KOLKWITZ & MARSSON ([Kolkwitz, R. e Marsson, M.. 1908. *Ökologie der pflanzlichen Saprobien*. Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft 26a: 505-519. (Translated 1967). *Ecology of plant saprobia*. In Kemp, L. E., W. M. Ingram & K. M. Mackenthum (eds), *Biology of Water Pollution*. Federal Water Pollution Control Administration, Washington, DC: 47-52.][Kolkwitz, R. e Marsson, M. 1909. *Ökologie der tierischen Saprobien*. Beiträge zur Lehre von des

biologischen Gewässerbeurteilung. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 2: 126-152.]) que estabeleceram a base conceitual para a construção de métodos de biomonitoramento.

Desde sua criação, até o final da década de 80, os índices bióticos predominavam como ferramentas de monitoramento biológico ([Metcalf, J.L. 1989. Biological Water Quality Assessment of Running Waters Based on Macroinvertebrate Communities: History and Present Status in Europe. Environmental Pollution, 60: 101-139.]; [Rosenberg, D.M. e Resh V.H. (Eds.). 1993. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Chapman and Hall (Eds.), New York, 488p]).

Mais recentemente, novas abordagens foram estabelecidas como ferramentas para o biomonitoramento, como os modelos preditivos (RIVPACS - Inglaterra; AusRivAs - Austrália; BEAST - Canadá, Modelo Neo Zelandês) (Wright, J. F.. 1995. Development and use of a system for predicting the macroinvertebrate fauna in flowing waters. Australian Journal of Ecology 20: 181-197.; Norris, R.H. e Georges, A.. 1993. Analysis and interpretation of benthic macroinvertebrate surveys. Chapman and Hall, New York (USA). pp. 234-286. 1993.; Reynoldson, T. B.; Bailey, R. C.; Day, K. E. e Norris, R.H.. 1995. Biological guidelines for freshwater sediment based on Benthic Assessment of Sediment (the BEAST) using a multivariate approach for predicting biological state. Australian Journal of Ecology 20:198-219.; Joy, M.K. e Death, R.G.. 2003. Biological assessment of rivers in the Manawatu-Wanganui region of New

Zealand using a predicative macroinvertebrate model. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 37: 367-379).

O desenvolvimento de índices multimétricos tem recebido prioridade nos EUA desde o fim da década de 80 ([Plafkin, J.L.; Barbour, M.T.; Porter, K.D.; Gross, S.K. e Huges R.M. 1989. Rapid bioassessment protocols for use in sites and rivers: Benthic macroinvertebrates and fish. U.S. Environmental Protection Agency, EPA, 444/4-89-001, Washington, DC.], [Barbour, M. T.; Gerritsen, J.; Griffith, G. E.; Frydenborg, R.; McCarron, E.; White, J. S. e Bastian, M. l. 1996. A framework for biological criteria for Florida streams using macroinvertebrates. Journal of North American Benthology Society. 15 (2), 185-211]; [Barbour, M.T.; Stribling, J.B. e Karr, J.R. 1995. The multimetric approach for establishing biocriteria and measuring biological condition. Pp: 63-76. In: Davis, W. & Simon, T. (eds). Biological Assessment and Criteria: Tools for Water Resource Planning and Decision Making.] [Lewis Publishers. Ann Arbor, Michigan; Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Griffith, G.E; Frydenborg, R.; McCarron, E.; White, J.S. e Bastian, M.L. 1996. A framework for biological criteria for Florida sites using benthic macroinvertebrates. J. N. Am. Benthol. Soc., 15(2): 185-211]); [Gibson, G.R.; Barbour, M.T.; Stribling, J.B.; Gerritsen, J. e Karr, J.R. 1996. Biological Criteria. Technical Guidance for Sites and Small Rivers. EPA/822-B-96-001. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Science and Technology, Washington, DC.]). Recentemente,

países da Comunidade Européia (CE) têm investido na padronização e utilização de índices multimétricos, seguindo as proposições definidas pela Diretiva do Quadro das Águas N° 2000/60/EC (EC, 2000 European Commission. The EU Water Framework Directive - integrated river basin management for Europe. Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html acesso em: 21 fev. 2008.). Nesse sentido, a CE formulou os projetos AQEM e STAR com o objetivo de padronização e intercalibração de procedimentos operacionais e desenvolvimento de diferentes índices multimétricos, baseados na fauna de macroinvertebrados (Pinto P.; Rosado, J.; Morais, M. e Antunes, I. .2004. Assessment methodology for southern siliceous basins in Portugal. *Hydrobiologia*, 516: 193-216; Bohmer, J.; Rawer-Jost, C. e Zenker, A. 2004. Multimetric assessment of data provided by water managers from Germany: assessment of several different types of stressors with macrozoobenthos communities. *Hydrobiologia*, 516: 215-228; Vlek, H. E.; Verdonschot, P. F. M. e Nijboer, R. C. 2004. Toward a multimetric index for assessment of Dutch stream using benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia* 516: 173-189; Buffagni, A.; Erba, S.; Cazzola, M. e Kemp, L. L. 2004. The AQEM multimetric system for the southern Italian Alpennines: assessing the impact of water quality and habitat degradation on pool macroinvertebrates in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia*, 516: 313-329; Furse, M.T.; Hering, D.; Brabec, K; Buffagni A.; Sandin, L.e Verdonschot, P.F.M. 2006. The Ecological Status of European Rivers:

Evaluation and Intercalibration of Assessment Methods. *Hydrobiologia* 566: 3-29).

A força da abordagem multimétrica está na habilidade de integrar informações dos vários aspectos de uma comunidade para fornecer uma classificação geral do nível de degradação do ecossistema, sem perder a informação proveniente das métricas individuais. As métricas devem ser baseadas em conceitos ecológicos sólidos e representar processos complexos do ecossistema, permitindo a avaliação de funções ecológicas. A utilização de métricas de diferentes naturezas pode permitir a avaliação qualitativa além da quantitativa, uma vez que uma métrica individualmente pode ser capaz de qualificar a origem do impacto.

Em geral, no início, todos os índices foram formulados considerando coletas e triagens exaustivas do levantamento da fauna bentônica de macroinvertebrados. Desta forma, os índices são construídos considerando uma base de dados biológicos de grande robusteza, porém de reduzida aplicabilidade em procedimentos de rotina.

Do ponto de vista prático, após o procedimento de coleta, todos os substratos amostrados, orgânicos (folhas/algas/macrófitas) e minerais (silt, areia, cascalho, pedra), são transportados para o laboratório e são lavados e, em seguida, inicia-se o processo de triagem e identificação do material biológico, ressaltando que a quantidade de material bruto coletado pode atingir um volume de 15 até 20 litros. Entre as desvantagens destas técnicas destacam-se os grandes volumes das amostras

coligidas que devem ser corretamente tratadas e armazenadas, o tempo empregado para a separação do substrato e o grande número de horas dispendidas na identificação de todos os espécimes, além da grande quantidade de álcool usado para a preservação do material. Destaca-se também que o número de espécimes coletados frequentemente atinge milhares de larvas, o que eleva de forma notável, os custos operacionais e o impacto ambiental.

Nesse contexto, protocolos de avaliação rápida vem sendo desenvolvidos como ferramentas simples e com baixos custos de aplicação para avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos. Esses protocolos combinam equipamentos de campo simples e baratos com processamento otimizado das amostras em laboratório.

Na Europa e Estados Unidos, atualmente usa-se a técnica da sub-amostragem, a qual consiste em contar e identificar uma parcela da comunidade obtida aleatoriamente da amostra total coletada em campo. O objetivo da subamostragem é gerar uma representação fiel e não-tendenciada de uma amostra maior. Ela deve ser aleatória e incorporar a heterogenidade e diversidade de habitats observados no campo. Isto faz com que haja redução do esforço requerido.

Com este sistema, todo o material coletado é trazido ao laboratório, lavado e mixturado através de diferentes técnicas, possibilitando que o material apresente-se homogêneo. Por meio de um subamostrador (bandeja dividida

em 24 áreas), escolhe-se aleatoriamente uma porção da amostra.

Protocolos de avaliação rápida dos EUA ([Plafkin, J.L.; Barbour, M.T.; Porter, K.D.; Gross, S.K. e Huges R.M. 1989. Rapid bioassessment protocols for use in sites and rivers: Benthic macroinvertebrates and fish. U.S. Environmental Protection Agency, EPA, 444/4-89-001, Washington, DC.], [Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Snyder, B.D.; e Stribling, J.B.. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.]) recomendam tradicionalmente a subamostragem pela contagem de número fixo. Nesses protocolos, o número mínimo de organismos recomendado para garantir eficiência de avaliação é de, no mínimo, 300 indivíduos; a fim de não causar muita instabilidade nas métricas do índice e fornecer resultados confiáveis para avaliação. Na prática, porém, há grande variação de número mínimo de organismos a serem contabilizados, dependendo da análise em curso. Adicionalmente, ao se comparar tamanhos de subamostras, constata-se a fragilidade de amostras muito pequenas.

Outro tipo de subamostragem é a por área, sendo esta inclusive procedimento padrão sugerido pelo AQEM. É indicada nesse protocolo a utilização de bandejas divididas em quadrats, e é então triada 25% da amostra total com um mínimo de 300 indivíduos. A subamostragem por área garante a aleatoriedade do procedimento, tornando-o menos subjetivo

e menos sujeito às variações inerentes à mudança de equipe. No entanto, permanecem os problemas relativos ao grande volume das amostras coligidas, seu armazenamento, conservação, separação do substrato, quantidade de álcool usado e da quantidade de espécimes coletados que podem atingir milhares de indivíduos entre larvas e adultos.

Independente do tipo de subamostragem, os métodos existentes no estado da técnica vêm sendo discutidos em diversos trabalhos dos países em que programas de biomonitoramento já são aplicados (União Européia, Austrália e EUA) ([Barbour, M. T.; Gerritsen, J.; Griffith, G. E.; Frydenborg, R.; McCarron, E.; White, J. S. e Bastian, M. I. 1996. A framework for biological criteria for Florida streams using macroinvertebrates. *Journal of North American Benthology Society*. 15 (2), 185-211]; [Countermanch, D. L. 1996. Commentary on the subsampling procedures used for rapid bioassessments. *Journal of North American Benthological Society* 15: 381-385]; [Somers, K.M.; Reid, R.A. e David S.M.. 1998. Rapid ecological assessment: how many animals are enough. *Journal of the North American Benthological Society* 17: 348-358.]; [Doberstein, C.P.; Karr, J.R.; Conquest, L.L. 2000. The effect of fixed-count subsampling on macroinvertebrate biomonitoring in small streams. *Freshwater Biology*, Volume 44 (2): 355-371]; [Lorenz, A.; Hering, D.; Feld, C. e Rolauuffs, P.. 2004. A new method for assessing the impact of hydromorphological degradation on the macroinvertebrate fauna of five German stream types. *Hydrobiologia* 516: 107-127]).

Um dos maiores problemas associados à subamostragem é a questão da riqueza de espécies. O número de táxons encontrado em uma amostra aumenta assintoticamente como função da área amostrada e do número de indivíduos na amostra. Sendo assim, é sempre esperado que, com aumento do esforço, se obtenha uma riqueza maior de espécies. A questão a ser observada, no caso específico da subamostragem para o biomonitoramento, é quando esse aumento deixa de ser significativo e, ao mesmo tempo, fornece a resposta à mudança da integridade do ecossistema. Além disso, o processamento completo desse tipo de amostra, com muitos indivíduos, é custoso demais.

Assim, verifica-se no estado da arte a questão de como realizar a subamostragem e qual o esforço ótimo, no sentido de acelerar a avaliação sem comprometer a validade ecológica da resposta ([Barbour, M.T.; Gerritsen, J.; Griffith, G.E; Frydenborg, R.; McCarron, E.; White, J.S. e Bastian, M.L. 1996. A framework for biological criteria for Florida sites using benthic macroinvertebrates. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 15(2): 185-211]; [Countermanch, D. L. 1996. Commentary on the subsampling procedures used for rapid bioassessments. *Journal of North American Benthological Society* 15: 381-385]; [Doberstein, C.P.; Karr, J.R.; Conquest, L.L. 2000. The effect of fixed-count subsampling on macroinvertebrate biomonitoring in small streams. *Freshwater Biology*, Volume 44 (2): 355-371]; [Nichols, S. e Norris, R. H.. 2006. River condition assessment may depend on the sub-sampling method: field live-sort versus laboratory sub-sampling of invertebrates

for bioassessment. *Hydrobiologia* 572: 195-213]). E o ideal é que a subamostragem preferencialmente seja feita em campo, quando não em laboratório.

Clarke e colaboradores (2006) (Clarke, R.T.; Furse, M.T.; Gunn, R.J.M.; Winder, J.M. e Wright, J.F.. 2002. Sampling variation in macroinvertebrate data and implication for river quality indices, *Freshwater Biology* 47: 1735-1751) estudaram o efeito da subamostragem diretamente nas métricas de diferentes tipos e verificaram que a precisão das medidas baseadas na riqueza de táxons é bastante afetada pelo tamanho da subamostra, o que é previsível pela relação espécie-área.

Além da análise do esforço amostral, é necessário verificar sempre se o aparato de subamostragem garante a aleatorização dos organismos, ou seja, que os organismos estejam em determinado quadrat ao acaso. Uma tendência determinada nessa etapa pode levar a erros na determinação do esforço mínimo de avaliação e, no contexto de um programa de biomonitoramento, erros de avaliação da integridade ecológica. Em termos biológicos, é preciso perguntar se os organismos estão aleatoriamente distribuídos no espaço, no caso, na bandeja de subamostragem. Se o padrão aleatório de fato existir, a distribuição de Poisson é o descritor estatístico apropriado para os dados (Krebs, C.J. 1998. *Ecological Methodology*. Benjamin/Cummings, Menlo Park.). A distribuição de Poisson assume que o número esperado de organismos de um determinado táxon é o mesmo em todos os

quadrats e é igual à média populacional, estimada pela média amostral.

Dentro deste contexto, vários subamostradores são encontrados no estado da arte. Basicamente estes consistem em uma bandeja plástica dividida em 24 áreas. Tais equipamentos permitem diminuir o tempo relativo na separação do substrato e identificação da fauna, mas não resolvem os problemas do grande volume das amostras coligidas, seu armazenamento, conservação, quantidade de álcool usado e da quantidade de espécimes coletados. Porém, por outro lado, geram danos aos espécimes em função do processo de homogeneização, o que dificulta a triagem e a identificação, além de não contribuir para com a preservação da biota.

É importante frisar que, no caso de procedimentos que economizam tempo e recurso, como a subamostragem, serem aplicados ao monitoramento biológico sem análise anterior da acurácia e precisão dos equipamentos e métodos empregados, a informação coletada pode ser inútil; resultando em desperdício de recursos ou ainda direcionamento equivocado das medidas de manejo. Por outro lado, a aplicação de procedimentos exaustivos que consomem muito tempo e recurso em laboratório, demorando em fornecer a resposta biológica, são impraticáveis para a aplicação de programas de biomonitoramento que devem avaliar a condição de centenas de corpos de água. Sendo assim, são necessários equipamentos e metodologias que possibilitem uma relação custo-benefício ideal, garantindo a aplicabilidade da

ferramenta, sem a perda do rigor científico e poder na inferência e decisão.

Desta forma, o desenvolvimento de novos equipamentos e metodologias de subamostragem que reúnam as características de utilização de pequenos volumes, distribuição aleatória da fauna, manutenção de sua integridade e respeito ambiental são necessários.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é a realização de biomonitoramento de corpos aquáticos sem apresentar as limitações técnicas das metodologias e dos subamostradores encontrados no estado da arte.

Uma primeira concretização da presente invenção se refere a um subamostrador que permite o acompanhamento ambiental sem o uso de grandes volumes de amostra, assegurando, no entanto, a riqueza de espécie e a rapidez na análise. O Subamostrador da presente invenção é constituído por um conjunto de estruturas independentes: duas bandejas, um separador e pernas de sustentação. O equipamento apresenta também um sistema de medição de seu correto posicionamento em campo e sistemas de embalagem e transporte. O subamostrador, diferentemente dos outros, é preferencialmente usado diretamente em campo. Como alternativa, o equipamento pode ser empregado também em laboratório, completamente montado, ou em bancada não utilizando as pernas.

Uma segunda concretização da presente invenção está relacionada à metodologia de subamostragem. Esta consiste em posicionar o subamostrador desta invenção corretamente

na superfície; adicionar o substrato coletado, no ambiente aquático, à bandeja interna; retirar o material de grande porte; escoar parte da água através da abertura do sistema de escoamento de água, sem eliminá-la totalmente; adicionar solução anestésica de maneira que os organismos ali presentes reduzam sua capacidade motora; homogeneizar o substrato; encaixar o separador na bandeja interna; abrir o sistema de escoamento de água para liberar a saída da solução anestésica; remover o substrato de quadrats selecionados aleatoriamente; acondicionar o substrato removido em álcool e transportar para laboratório.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é uma vista geral do conjunto que compõe o subamostrador objeto da presente invenção.

A Figura 2A é uma vista frontal da bandeja interna e a Figura 2B é uma vista frontal da bandeja externa do subamostrador da Figura 1.

A Figura 3 é uma vista em perspectiva da porção inferior da bandeja interna da Figura 2A, mostrando um sistema de apoio da bandeja interna e o sistema de escoamento de água.

A Figura 4 é uma vista superior do sistema separador do subamostrador da Figura 1.

A Figura 5 - Valores críticos do teste de Qui-Quadrado do Índice de dispersão para $\alpha=0,05$ e $n<101$.

A Figura 6 - Curvas de esforço amostral mostrando média e desvio padrão dos 6 pontos amostrados: (a) acúmulo de riqueza em UTOs e (b) acúmulo de riqueza em famílias.

A Figura 7 - Riqueza esperada pela análise de rarefação em comunidades de diferentes tamanhos nos 6 riachos (A,B,C,D,E e F) e os valores médios.

A Figura 8 - Avaliação da variação dos valores das métricas entre diferentes tamanhos de subamostras: (a) métricas de riqueza e diversidade, (b) métricas de composição, (c) métricas tróficas, (d) métricas de tolerância.

A Figura 9 - Valores da média de similaridade com a amostra total (24 quadrats) em subamostras de tamanhos crescentes.

A Figura 10 - comparação entre valores de medidas de impacto (métricas) utilizando a comunidade encontrada em 6 quadrats em áreas minimamente impactadas (REF), com distúrbios de intensidade média (INT) e fortemente alteradas (POB).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O Subamostrador da presente invenção é constituído por um conjunto de estruturas independentes: duas bandejas, um separador e pernas de sustentação, conjunto esse representado pelo numeral **(10)** na Figura 1.

É importante salientar que o subamostrador da presente invenção possui ainda um sistema de medição do correto posicionamento do equipamento em campo, e alternativamente, sistema de embalagem e transporte, conforme exemplificado na Figura 1.

A confecção das estruturas do subamostrador pode ser realizada em qualquer material factível para um técnico no

assunto. Preferencialmente, os materiais mais adequados são aço, alumínio, resina ou plástico.

A bandeja interna (22) mostrada na Figura 2A, de tamanho tal a ser encaixada na bandeja externa (Figura 2B), apresenta em seu fundo uma saída para escoamento de água, preferencialmente na forma de furos (24) distribuídos igualmente para o escoamento da mesma. A referida bandeja interna (22) possui ainda uma rede (não mostrada) para a filtragem do complexo biota-sedimento de tamanho adequado em relação ao tipo de estudo a ser realizado, o que pode ser variável, preferencialmente, entre 500µm até 1 mm. A Figura 3 mostra o lado externo da base da bandeja interna (22) onde há um sistema de apoio (26) em forma livre. A forma livre do sistema de apoio (26) é selecionada de maneira a não impedir o fluxo de água, podendo ser em forma de "S", mas não limitado a esta, disposto em direção paralela à linha de fluxo da água evitando conjuntamente a perda de forma da bandeja e o fenômeno de refluxo. Opcionalmente pode existir a presença de alças (28) na bandeja interna (22) para facilitar o seu manuseio. (Figura 2A)

A bandeja externa (32) de tamanho adequado à amostra a ser coletada, preferencialmente variando de 60x50x16 até 36x36x10 cm, é munida de borda de reforço para auxiliar na sustentação do peso e manter a forma do aparelho. A dita bandeja externa (32) apresenta: sistema de saída (34) de água (a exemplo, mas não limitado a torneira ou tampa com rosca). Adicionalmente, a bandeja externa (32) possui um sistema de sustentação de pernas e um sistema para o

correto posicionamento (horizontal) do aparelho em campo. Em preferidas concretizações da presente invenção, possíveis sistemas de posicionamento que podem ser utilizados são o sistema do "tipo bolha" ou de "tipo pêndulo", não se limitando a estes. (Figura 2b)

O sistema separador (42), mostrado na Figura 4 consiste de um conjunto de placas encaixadas perpendicularmente entre si com função de separar o material coletado do substrato. Este dispositivo apresenta tamanho em acordo com a caixa interna na qual deve ser perfeitamente encaixado, separando o material em 24 quadrats. Opcionalmente, a presença de alças no sistema separador facilita o seu manuseio. (Figura 3)

As pernas de sustentação (11) constituem um conjunto de varas, podendo variar o seu número desde que não seja inferior a quatro, de altura conforme aspectos ergonômicos, preferencialmente 80 cm de tamanho, mas não se limitando a este, podendo ser ainda reguláveis ou dobráveis para facilitar o transporte do equipamento. De acordo com o proposto nesta invenção, o uso das pernas de sustentação (11) é facultativo, não havendo necessidade quando a subamostragem for realizada em laboratório.

Assim, em uma preferida concretização da invenção, o subamostrador, diferentemente dos outros encontrados no estado da arte, é usado diretamente em campo.

Para o perfeito uso do subamostrador da presente invenção, o mesmo é posicionado horizontalmente, no local de coleta, regulando de maneira adequada às pernas (11) com o auxílio do sistema de correto posicionamento. Em seguida,

a bandeja interna (22) é inserida na bandeja externa (32). O material biológico que consiste no substrato recolhido é armazenado na bandeja interna (22) e coberto com água do rio. Galhos, pedras e folhas de grande tamanho são removidos manualmente por operadores por um período padrão, por exemplo, entre 10 e 20 minutos. Após este trabalho, parte da água é removida abrindo a saída de água (34) presente na bandeja externa (32); removendo parte dessa água, de forma a deixar um pouco de água ainda no fundo da bandeja interna (22).

A seguir, é adicionada à água presente nas bandejas, uma quantidade eficaz de anestésico proporcionalmente à caixa utilizada. O anestésico empregado na presente invenção deve ser reversível permitindo a sobrevivência da biota que não for usada nas etapas posteriores da subamostragem. Em uma preferida concretização desta invenção, o anestésico utilizado é a água gasosa. Porém, outros anestésicos reversíveis conhecidos no estado da técnica podem ser empregados nesta invenção. Para facilitar a compreensão, a proporção preferencial é de dois litros para uma caixa de 60x50x16 preenchida com 10 cm de água. Este procedimento visa anestésiar os animais ali presentes garantindo, portanto, uma distribuição homogênea da biota no subamostrador. Após o tempo de espera necessário para o anestésico agir, todo o material é misturado na bandeja interna (22). No caso de se utilizar a água gasosa, esta etapa pode durar entre 5 a 15 minutos.

Sucessivamente à operação de homogeneização, o sistema separador (42) é posicionado na bandeja. A saída da água

(34) é aberta até a total remoção da solução anestésica do subamostrador. Utilizando sorteio, de acordo com a metodologia empregada, quadrats do separador (42) são selecionados e o material nele presente é removido. Preferencialmente recomenda-se o sorteio de 4 a 6 dos 24 quadrats. Em seguida, o material presente nos quadrats selecionados é removido. As amostras coletadas são acondicionadas em recipientes adequados, como por exemplo, mas não limitados a sacos de plásticos, e fixadas. A fixação pode ser feita utilizando-se compostos orgânicos, tais como, mas não limitados à álcool concentrado, de 70% a 80%; formol de 4% a 10% ou uma mistura dos dois para o transporte até o laboratório, onde a identificação dos espécimes será realizada.

O material restante na bandeja interna é devolvido ao ambiente aquático.

Resta claro que o subamostrador da presente invenção, através de sua utilização em campo, permite uma rápida subamostragem do material coletado.

De acordo com o proposto nesta invenção, a realização da subamostragem através do equipamento e da metodologia descritos traz, além da otimização no tempo gasto, uma série de vantagens quando comparados com os equipamentos e metodologias encontrados no estado da técnica.

Considerando um rio contornado por árvores, com muitas folhas no fundo, ao ser empregado o subamostrador da presente invenção verifica-se uma diminuição considerável do volume de material. Ao se comparar este ponto com o que é encontrado no estado da técnica, é verificado uma redução

no volume de material lavado em campo em cerca de 2/3, e após a lavagem do substrato a redução é de 3/4. Além disso, com a presente invenção, evita-se a etapa de lavagem do material biológico em laboratório, fase que requer um investimento em tempo bastante elevado.

No que concerne o transporte e a preservação sob conservante, a utilização do subamostrador da presente invenção reduz em cerca de 80% do volume do material coligido, quando comparado com o estado da arte, isto é, com a subamostragem clássica.

A utilização deste equipamento e sua metodologia contribuem de forma mais eficaz para que os macroinvertebrados permaneçam íntegros quando comparado a outros subamostradores encontrados no estado da técnica, o que, por conseguinte, permite a realização de uma melhor triagem e classificação taxônomica. Esta característica é dada em função do sistema de homogeneização do material presente na bandeja interna. No subamostrador da presente invenção, o material é coligido com presença de um grande volume de água e com os espécimes ainda vivos, contrariamente às outras técnicas onde a homogeneização é feita no laboratório à seco e com espécimes previamente fixados em álcool. Este provoca o endurecimento dos tecidos musculares favorecendo a danificação dos animais.

A homogeinização proposta pela presente invenção contribui enormemente também para a aleatorização dos organismos, ou seja, favorece que os organismos estejam em determinado quadrat ao acaso.

Outra diferença com relação ao estado da técnica é verificada com relação à biota que sobra no subamostrador em campo. Esta biota normalmente é constituída por milhares de larvas e adultos de dezenas de grupos taxonômicos diferentes. De acordo com a presente invenção, tais organismos são devolvidos ao ecossistema vivos. Pois, uma vez em contato com a água do ambiente (rio), o efeito anestésico provocado pela água gasosa, por exemplo, é logo revertido.

A invenção ora apresentada pode ser considerada como ambientalmente correta, impactando minimamente o local onde é feita a coleta, além de se apresentar muito eficiente; reduzindo os tempos operacionais, o custo, e mantendo, por outro lado, a aleatoriedade, heterogeneidade/riqueza de espécies, fatores estes fundamentais em programas de biomonitoramento das águas.

Apesar da utilização do subamostrador da presente invenção ser preferencialmente em campo, encontra-se dentro do escopo da invenção o emprego do mesmo também em laboratório, completamente montado, ou em bancada não utilizando as pernas, permitindo a subamostragem de material fixado previamente em campo.

A seguir são apresentadas concretizações da presente invenção, ressaltando que a mesma não se limita aos exemplos abaixo, mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Avaliação do subamostrador

Coleta dos organismos

Para a avaliação da eficácia da subamostragem realizada pelo equipamento e metodologia da presente invenção, foram utilizados dados de 6 riachos considerados como áreas minimamente impactadas. Os riachos são localizados na bacia dos rios Macacu e Guapimirim, uma área de Floresta Ombrófila densa, pertencente ao domínio da Mata Atlântica, na Serra do Mar, estado do Rio de Janeiro (Tabela 1). Os critérios para definição de áreas de referência *a priori* foram: protocolo de avaliação visual de habitat com condição ótima ou boa; mais de 75% da área da bacia acima do ponto florestada; Oxigênio Dissolvido acima de 6 mg/L; Coliformes fecais/100 mL <10.

O procedimento de coleta considerou as amostragens do tipo multi-habitat, com coleta proporcional à disponibilidade do substrato no trecho do rio estudado. Foi utilizado amostrador do tipo *kick* com malha de 500 micras, um total de 20 réplicas por ponto sendo, que cada uma consiste em um (1) m² de substrato levantado. Sendo assim, em torno de 20 m² de substratos do rio foram coletados. A amostra foi unificada e conservada em etanol 80%. Nos 6 riachos estudados, a coleta foi realizada pela mesma equipe e buscou-se máxima padronização do procedimento.

Tabela 1 - Caracterização dos pontos de coleta

Rios	Código	Ordem	Altitude (m)	Protocolo de Avaliação Visual
Rio do Andrew	A	2	930	Ótima
Rio Soberbo	B	3	100	Ótima
Rio Manoel Alexandre	C	4	80	Ótima
Rio Iconha	D	1	1220	Ótima
Tributário Macacu (Rio da Placa)	E	1	1100	Boa
Rio do Gato	F	3	90	Boa

Procedimento de subamostragem

Nesta concretização da presente invenção, a subamostragem foi realizada por área e para isso foi utilizado um aparato de subamostragem, dividido em 24 quadrats, de tamanho 64x36 cm.

O aparato consiste em duas bandejas plásticas (bandeja interna e bandeja externa) encaixadas tal como anteriormente aqui descrito.

A bandeja interna (22), como apresentado na Figura 2A, possui furos distribuídos homogeneamente no fundo e uma malha de 500 μm (igual a do amostrador). Em seu lado externo, há um sistema de apoio em forma de "S" em direção paralela à linha de fluxo de água.

Já a bandeja externa (32), utilizada nesta análise, consiste em uma bandeja para o escoamento da água com uma

torneira lateral, apresentando também o sistema de correto posicionamento "do tipo bolha", conforme já demonstrado.

O sistema separador empregado, em acordo com a Figura 4, consiste num conjunto de placas encaixadas perpendicularmente de forma a estar perfeitamente encaixado na bandeja interna (22), separando o material em 24 quadrados (quadrats). As alças presentes no sistema separador facilitaram o manuseio desta parte do equipamento.

As amostras foram lavadas em laboratório na bandeja interna (22) do equipamento de subamostragem para a retirada do material mais grosseiro, como folhas grandes e galhos. Após esta etapa, a bandeja interna foi preenchida com cerca de 15 litros de água, e o material foi homogeneizado por 5 minutos para assegurar a distribuição uniforme de toda a amostra na superfície da bandeja. A torneira (34) foi então aberta e a água escoou de forma homogênea para a bandeja externa (32). Então, o separador (42) de 24 quadrats de alumínio foi encaixado na bandeja interna (22). O material correspondente a cada quadrat foi retirado e individualizado em um saco plástico.

Esse procedimento foi repetido para os 6 pontos amostrais, resultando em 144 (24 x 6) sacos plásticos correspondentes a 144 quadrats. Cada quadrat foi então triado à exaustão e os organismos identificados ao nível de gênero (exceto Lepidóptera e Díptera que foram identificados em nível de família) com auxílio de microscópio estereoscópio. Considerando que cada amostra de um rio representa 20 m² de substrato, cada quadrat equivale

então a $0,83 \text{ m}^2$ e a aproximadamente 4,2% da amostra total. Foi contabilizado o tempo de processamento (triagem e identificação) de cada quadrat, para verificar o ganho, em termos de tempo e, conseqüentemente, recursos economizados pelo procedimento de subamostragem.

A análise de similaridade realizada demonstrou que as comunidades com 4 quadrats já apresentam altos valores de similaridade com a amostra total de 24 quadrats pelos três índices utilizados e os desvios-padrões menores que 0,01. Para o índice de Morisita, mesmo a subamostra de menor tamanho apresenta similaridade de 98% com a amostra total. O índice de Bray-curtis apresentou os menores valores de similaridades, no entanto apontou que uma subamostra de 4 quadrats já possui 70% de similaridade com a amostra total. Os resultados das análises anteriores mostram assim que a comunidade de macroinvertebrados encontrada em 6 quadrats é similar à encontrada na amostra completa dos 24 quadrats em termos de estrutura e composição.

Exemplo 2

Análise da distribuição dos organismos (verificação da aleatoriedade)

Para testar se os táxons subamostrados conforme o Exemplo I possuem distribuição aleatória nos quadrats foi realizado um teste pelo Índice de Dispersão (Krebs, C.J.. 1998. Ecological Methodology. Benjamin/Cummings, Menlo Park.). O índice de dispersão é calculado através da razão entre a variância observada e a média observada. É então aplicado um teste de Qui-quadrado bi-caudal, considerando a hipótese nula que os dados seguem a distribuição de

Poisson. O X^2 é calculado através da multiplicação do valor do índice de dispersão pelo número de graus de liberdade (n-1).

Há duas possíveis direções de desvio. Se os organismos forem uniformemente distribuídos, a variância será bem menor que a média e o Índice de dispersão se aproximará de zero. Caso os organismos estiverem agregados, a variância observada seria maior que a média e o Índice de dispersão seria bem maior que 1 (um) (Krebs, C.J.. 1998. Ecological Methodology. Benjamin/Cummings, Menlo Park.) (Figura 5). Considerando $\alpha=0,05$, e 23 graus de liberdade, os valores de X^2 nesse caso devem estar entre 11 e 37 para que a hipótese de distribuição aleatória possa ser aceita. Esse teste foi realizado para todos os táxons em nível de família, considerando os 24 quadrats nos 6 rios.

Foi verificado que a maioria das famílias de macroinvertebrados subamostradas apresentaram distribuição aleatória, semelhante à de Poisson nos 24 quadrats. O Índice de dispersão médio variou em valores pouco maiores que 1 nos 6 riachos. Os resultados resumidos estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das abundâncias e riquezas nos quadrats dos 6 rios estudados

	Rio do Andrew	Rio Soberbo	Rio Manoel Alexandre	Rio Iconha	Rio da Placa	Rio do Gato	Médias
Abundância Total	2435	2193	2722	2663	1684	1939	2272,667
Abundância média por quadrat	101,4583	91,375	114,125	110,9583	70,16667	80,79167	94,81249
Desvio Padrão	24,92769	20,16845	27,81978	28,95045	20,36977	18,15867	23,39914
Abundância média em 4 quadrats	421	405	485	482	295	319	401,1667
Abundância média em 6 quadrats	709	595	770	699	434	479	614,3333
Abundância média em 8 quadrats	890	777	994	926	562	603	792
Abundância média em 12 quadrats	1332	1117	1413	1345	839	909	1159,167
Riqueza Total (UTOs)	57	52	61	58	45	50	53,83333

Assim, o procedimento e o aparato de subamostragem da presente invenção garantiram a distribuição aleatória dos organismos. Isto foi motivado, principalmente, pela metodologia aqui descrita, a qual evita ao máximo que organismos não sejam amostrados por falha no procedimento de homogeneização da amostra.

Exemplo 3

Avaliação da riqueza de táxons (determinação do esforço necessário).

É importante salientar que a amostragem em campo deve ser representativa da heterogeneidade de habitats existentes e deve ser um procedimento padronizado para garantir a comparabilidade dos resultados.

Para a comprovação da eficácia do equipamento e da metodologia da presente invenção quanto à representatividade dos táxons, foi feita a determinação da curva do coletor utilizando as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), ou seja, a melhor resolução taxonômica possível. Foi realizada também a curva do coletor para a fauna de macroinvertebrados identificada apenas em família.

A Figura 6 apresenta as curvas obtidas e mostram a média e o desvio padrão da riqueza acumulada em cada quadrat nos 6 rios. É possível verificar, visualmente que, a partir do sexto quadrat, a riqueza acumulada começa a apresentar tendência de estabilização conforme a Figura 6a.

Foi verificado, também, que as abundâncias mostraram-se diferentes entre os pontos, e isso implica em diferentes riquezas com aumento da mesma em função do número de organismos na amostra Figura 6b.

A curva de rarefação realizada considerou comunidades com 100 a 1600 organismos nos 6 pontos amostrais. O resultado da análise encontra-se na Figura 7, onde é possível observar os valores absolutos das riquezas esperadas em cada riacho para cada tamanho de amostra. A linha de bolas pretas indica as médias. Tendo em vista que a abundância média de 6 quadrats foi de 614 indivíduos, pode-se considerar então que 600 indivíduos equivalem a 6 quadrats. Outro ponto a ser ressaltado é que o acréscimo de 1200 indivíduos na amostra (de 400 para 1600) levou a um aumento médio de 10 UTOs.

Assim, para o exemplo em questão, foi determinado que o uso de 6 quadrats, que somam 25% da amostra e representam em torno de 5 m² de substrato de rio amostrado, foi suficiente para aplicação em programas de biomonitoramento ao se utilizar o equipamento e a metodologia da presente invenção. Isto é, os resultados mostraram que a comunidade de macroinvertebrados presente em 6 quadrats é bastante similar à comunidade presente na amostra total de 24 quadrats.

E mais, o equipamento bem como a metodologia desta invenção foram capazes de gerar dados robustos para a avaliação biológica, comparando áreas com diferentes intensidades de impacto. No geral, esse é o teste mais importante porque avalia diretamente a eficiência do tamanho de amostra em diferenciar áreas impactadas de áreas de referência.

Exemplo 4

Tamanho da subamostra e métricas

A análise realizada para avaliar o efeito direto do tamanho de subamostra nos valores das medidas biológicas, que poderiam compor um índice multimétrico, se deu através da definição de subcomunidades de 4, 6, 8, 12 e 24 quadrats. Os resultados foram apresentados através de Box-Plots, considerando as medianas e os percentis 25-75% dos valores das métricas nos 6 riachos em cada uma dessas subcomunidades geradas aleatoriamente. Foi realizado então um teste comparando o valor obtido da métrica para um determinado tamanho de subamostra (4, 6, 8 ou 12) com a amostra total (24 quadrats).

As métricas escolhidas, para análise da subamostragem realizada pelo equipamento e metodologias descritos no Exemplo I, foram: riqueza, abundância relativa, grupamentos tróficos e tolerância. A Figura 8 apresenta a avaliação dos valores destas métricas nos diferentes tamanhos de subamostras.

Quanto às métricas que medem apenas riqueza (total de família e de Ephemeroptera/Plecoptera /Trichoptera), estas parecem ser as mais afetadas pelo tamanho da subamostra, uma vez que a diferença entre o valor da métrica para 4 e 24 quadrats é significativa pelo teste de *Mann-Whitney* conforme Figura 8a. Já a Diversidade de Shannon não demonstrou ser afetada por isso, não apresentando diferença significativa.

Já as métricas de abundância relativa, %EPT, %Díptera, %Coleoptera e %Plecoptera se mostraram estáveis ao longo

dos diferentes tamanhos de subamostras, não apresentando variação significativa entre elas, conforme pode ser observado na Figura 8b. Isto mostra indiretamente que a amostra foi bem distribuída ao longo da bandeja; evidenciando, mais uma vez, que o equipamento e a metodologia propostos na presente invenção são capazes de homogeneizar corretamente o material coletado.

A Figura 8c apresenta dados das métricas de grupamentos tróficos que corresponde à abundância desses grupamentos funcionais em relação à abundância total (%Filtradores e %Fragmentadores). Ambos grupamentos apresentaram estabilidade em seus valores nos diferentes tamanhos de subamostras, demonstrando que a proporção desses organismos se mantém independente do tamanho da subamostra.

Em se tratando de métricas avaliadoras da tolerância, duas foram analisadas: IBE-IOC e a medida Baetidae/Ephemeroptera.

A primeira, o IBE-IOC, é um índice biótico baseado nas tolerâncias dos diferentes gêneros e famílias de macroinvertebrados bentônicos; sendo por si só, uma ferramenta de avaliação, fornecendo uma classificação do local de coleta em categorias de diferentes níveis de impacto. Um erro amostral, que acarrete em perda de sensibilidade do índice, pode então significar um erro de avaliação e direcionar de forma errada as medidas de manejo necessárias. Este índice varia de 0 a 15 e, quanto maior seu valor, melhor a integridade biológica do local, sendo considerado uma medida de integridade. O fato de que ele,

na análise comparativa entre áreas de referências, intermediárias e impactadas, foi sensível com uma comunidade de 6 quadrats indica que esse tamanho de subamostra não afeta a sensibilidade dessa ferramenta. E a partir de 6 quadrats, a comunidade já obtém pontuações muito semelhantes no índice. Apenas a subamostra de 4 quadrats apresentou diferença significativa.

A medida *Baetidae/Ephemeroptera* também é uma medida direta de tolerância, porque mede a relação entre a família mais tolerante dos ephemeropteras e a abundância total da ordem. Em todas as medidas de abundância relativa não foi observada diferença significativa entre os diferentes tamanhos de subamostras, de acordo com a Figura 8d.

Desta forma, constata-se que ambos, equipamento e metodologia descritos no Exemplo I apresentam a acurácia e precisões necessárias para o estabelecimento e análise das métricas requisitadas para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.

Exemplo 5

Análise de similaridade em termos de composição e estrutura nos diferentes tamanhos de subamostras.

A análise de similaridade realizada utilizou três índices de avaliação: Morisita, Bray-curtis e Sorensen. A Figura 8 descreve a média de similaridade com a amostra total em subamostras de tamanhos crescentes, sendo que os desvios-padrões não foram assinalados no gráfico da figura porque todos foram menores que 0,01.

As comunidades com 4 quadrats já apresentavam altos valores de similaridade com a amostra total de 24 quadrats

pelos três índices utilizados. Para o índice de Morisita, (Morisita 1959) mesmo a subamostra de menor tamanho apresenta similaridade de 98% com a amostra total. O índice de Bray-curtis (Bray & Curtis 1957) apresentou os menores valores de similaridades, no entanto apontou que uma subamostra de 4 quadrats já possui 70% de similaridade com a amostra total (Figura 8d).

A análise da curva de esforço amostral aponta que, em unidades taxonômicas operacionais, o acúmulo de riqueza deixa de ser significativo em 6 quadrats. Todas as métricas, inclusive as de riqueza de táxons, possuem valores semelhantes em amostras com tamanho a partir de 6 quadrats. A análise de similaridade apontou que amostras de 4 quadrats possuem altos valores de similaridade com amostras de 24 quadrats, conforme apresentado na Figura 9.

Todas essas informações demonstram que uma comunidade encontrada em 6 quadrats é bastante semelhante àquela encontrada na amostra total de 24 quadrats, tanto em estrutura, como em riqueza e composição.

Exemplo 6

Validação do Tamanho da subamostra.

Para testar se realmente uma amostra de 6 quadrats é capaz de servir como base para um programa de biomonitoramento, foi realizada uma comparação direta entre as 6 áreas de referência consideradas nessa avaliação conforme Exemplo I, e 6 áreas intermediárias e fortemente impactadas de conjuntos de dados independentes. A avaliação da gravidade do impacto foi realizada através do protocolo visual de habitat modificado para a realidade brasileira.

avaliando o estado de conservação do leito do rio e das suas margens, e de análises físico-químicas (oxigênio dissolvido, pH, nitritos, nitratos, fosfatos).

A comparação foi realizada através do cálculo de 4 medidas diretas do impacto que são freqüentemente incluídas em índices multimétricos, ou representam, por si sós, um índice (IBE-IOC). Foi realizado um teste de *Mann-Whitney* para verificar a significância da diferença e confirmar se realmente há distinção entre as diferentes classes de impacto.

A Figura 10 descreve a comparação entre valores de medidas de impacto (métricas) utilizando a comunidade encontrada em 6 quadrats em áreas minimamente impactadas (REF), com distúrbios de intensidade média (INT) e fortemente alteradas (POB). As 4 medidas avaliadoras consideradas apresentaram sensibilidade alta para detectar as diferenças entre as classes de impacto. Mesmo a classe intermediária, que muitas vezes apresenta distúrbios sutis, foi diferenciada pela comunidade de 6 quadrats.

Exemplo 7

Tempo de subamostragem

Nesta concretização da invenção, se apenas uma pessoa realizar o processamento de subamostragem da amostra coletada de acordo com o Exemplo I, uma subamostragem de 6 quadrats resultará em economia de 12 horas no processamento de uma amostra de área minimamente impactada.

Cabe ressaltar que a perda de alguns táxons, inerente a qualquer técnica de subamostragem, na presente invenção não trouxe praticamente nenhuma alteração na geração e

funcionamento das métricas de um índice, garantindo a robustez científica da ferramenta de avaliação da integridade ecológica dos riachos analisados.

Todos estes resultados apresentados nos exemplos acima mostram que o procedimento de subamostragem, realizado através do equipamento e metodologia da presente invenção, permite a aplicabilidade dos mesmos no biomonitoramento de sistemas aquáticos; garantindo, sobretudo, o rigor científico na obtenção dos índices multimétricos.

REIVINDICAÇÕES

1) Equipamento de subamostragem de macroinvertebrados aquáticos caracterizado por ser constituído por uma bandeja externa com sistema de escoamento, uma bandeja interna, um separador e pernas de sustentação de uso facultativo, onde a bandeja interna se encaixa na bandeja externa.

2) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela bandeja externa apresentar tamanho adequado à amostra, ser munida de borda de reforço de maneira a auxiliar na sustentação do peso e manter a forma do equipamento, conter sistema de saída da água, um sistema de sustentação de pernas e de um sistema para o correto posicionamento do aparelho.

3) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pela bandeja externa apresentar dimensão variando entre 60x50x16 até 36x36x10 cm.

4) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo sistema de saída da água encontrar-se munido de torneira ou de tampa com rosca.

5) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo sistema para o correto posicionamento do aparelho poder ser o do tipo bolha ou do tipo pêndulo.

6) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela bandeja externa, conter em seu fundo de saída de escoamento de água, uma rede para a filtragem do complexo biota-sedimento, e no lado externo da base, um sistema de apoio e opcionalmente alças.

7) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela saída de escoamento de água consistir em furos distribuídos igualmente em sua base.

8) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato do sistema de apoio estar disposto em direção paralela à linha de fluxo da água de tal forma a evitar conjuntamente a perda de forma da bandeja e o fenômeno de refluxo.

9) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato do sistema de apoio ser em forma de "S".

10) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de a rede para a filtração do complexo biota-sedimento apresentar malha adequada em relação ao tipo de estudo, podendo variar entre 500µm até 1 mm.

11) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que o separador consiste em um conjunto de placas encaixadas perpendicularmente entre si, apresentando 24 quadrats, de tamanho em acordo com a caixa interna na qual deve ser perfeitamente encaixado, sendo munido opcionalmente de alças.

12) Equipamento de subamostragem de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato das pernas consistirem de varas, podendo variar o seu número desde que não seja inferior a quatro, sendo opcionalmente reguláveis ou dobráveis, e de uso facultativo.

13) Método de subamostragem de macroinvertebrados aquáticos utilizando o equipamento de descrito na reivindicação 1 caraterizada por compreender as etapas de:

a) posicionar o subamostrador corretamente na superfície;

b) adicionar o substrato coletado no ambiente aquático à bandeja interna;

c) retirar o material de grande porte;

d) escoar parte da água através da abertura do sistema de escoamento de água, sem eliminá-la totalmente;

e) adicionar solução anestésica de maneira que os organismos ali presentes sejam sensibilizados;

f) homogeneizar o substrato;

g) encaixar o separador na bandeja interna;

h) abrir o sistema de escoamento de água para liberar a saída da solução anestésica;

i) remover o substrato de quadrats selecionados aleatoriamente;

j) acondicionar o substrato removido conforme a etapa (i) em solução adequada ao transporte para o laboratório.

14) Método de subamostragem de acordo com a reivindicação 13 caraterizada pelo anestésico ser reversível.

15) Método de subamostragem de acordo com a reivindicação 14 caraterizada pelo anestésico reversível ser água gasosa.

16) Método de subamostragem de acordo com a reivindicação 13 caraterizada pelo número de quadrats selecionados aleatoriamente variar entre 4 e 6.

17) Método de subamostragem de acordo com a reivindicação 13 caraterizada pelo fato de que a solução adequada para o transporte do material é constituída por compostos orgânicos.

18) Método de subamostragem de acordo com a reivindicação 17 caraterizada pelo fato de que os compostos orgânicos podem se selecionados dentre álcool, formol ou uma mistura deles.

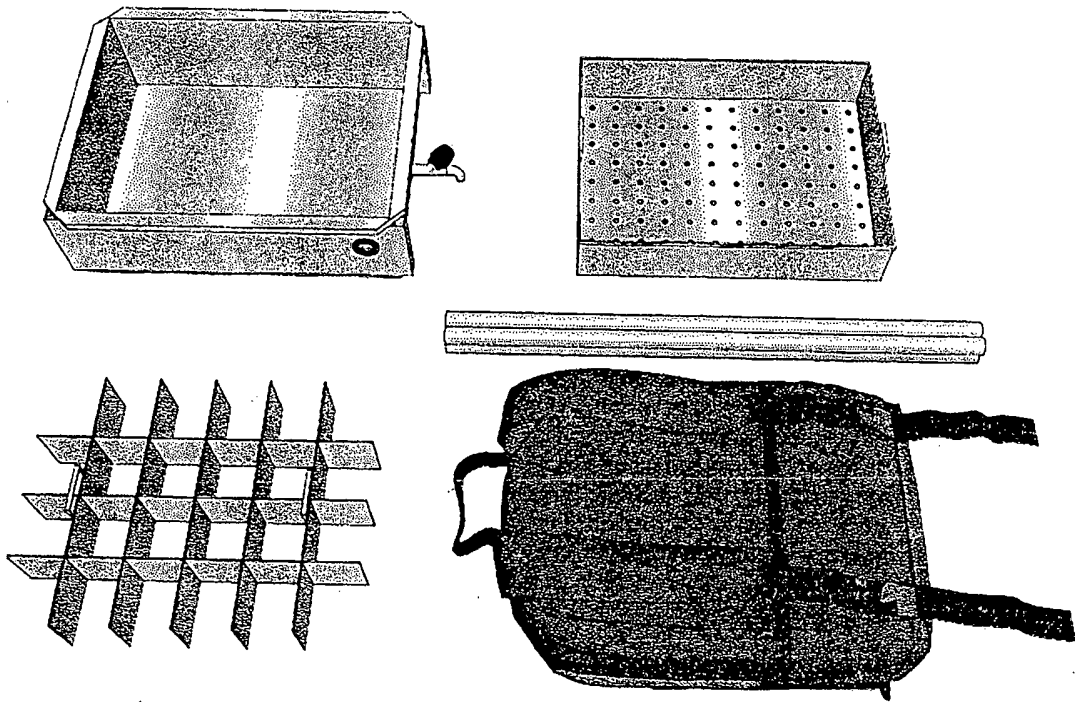


FIGURA 1

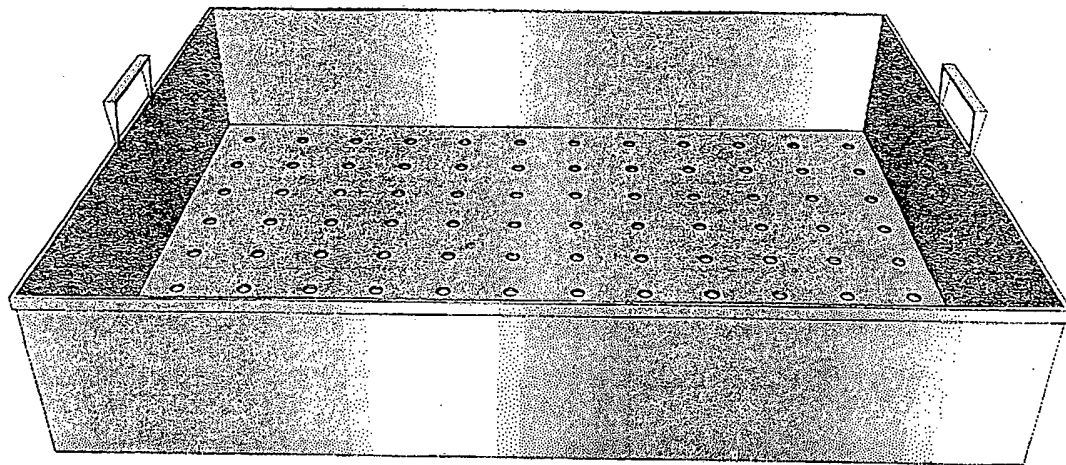


FIGURA 2A

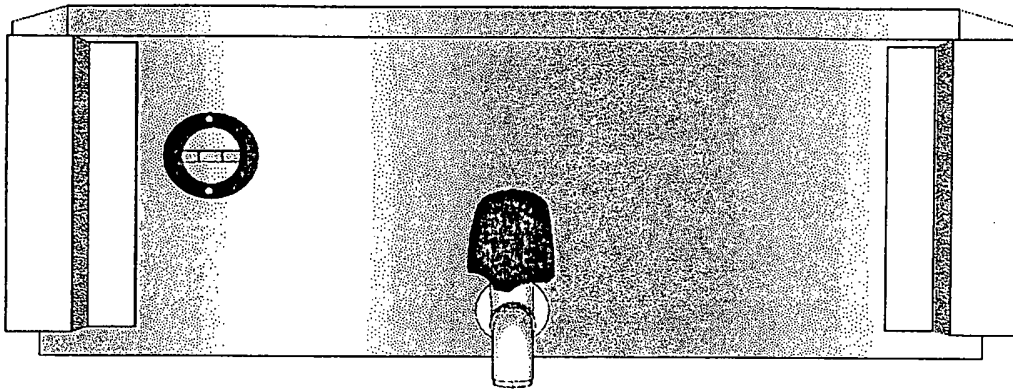


FIGURA 2B

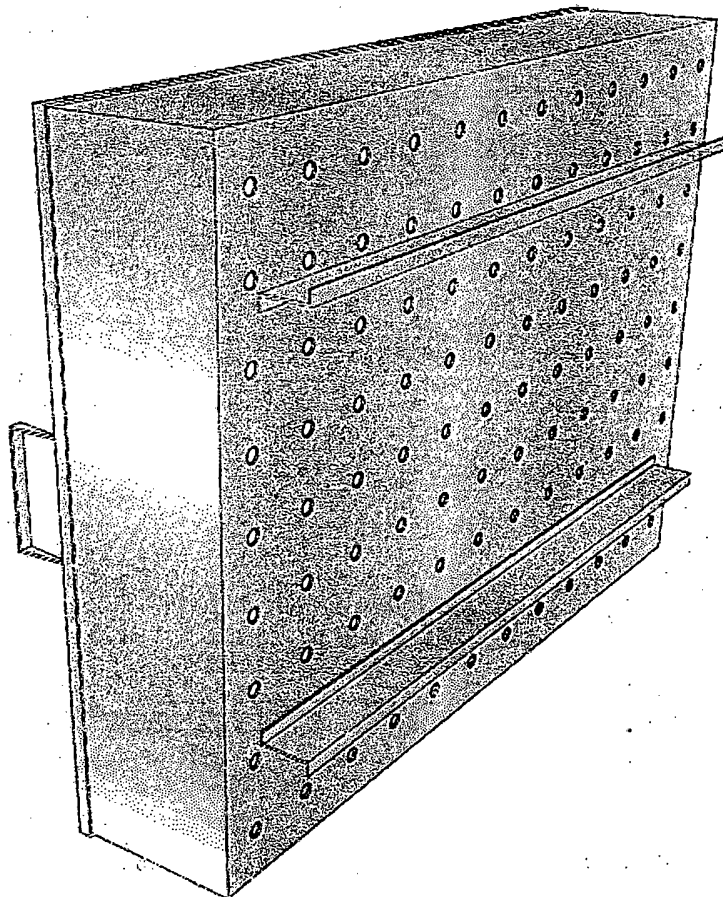


FIGURA 3

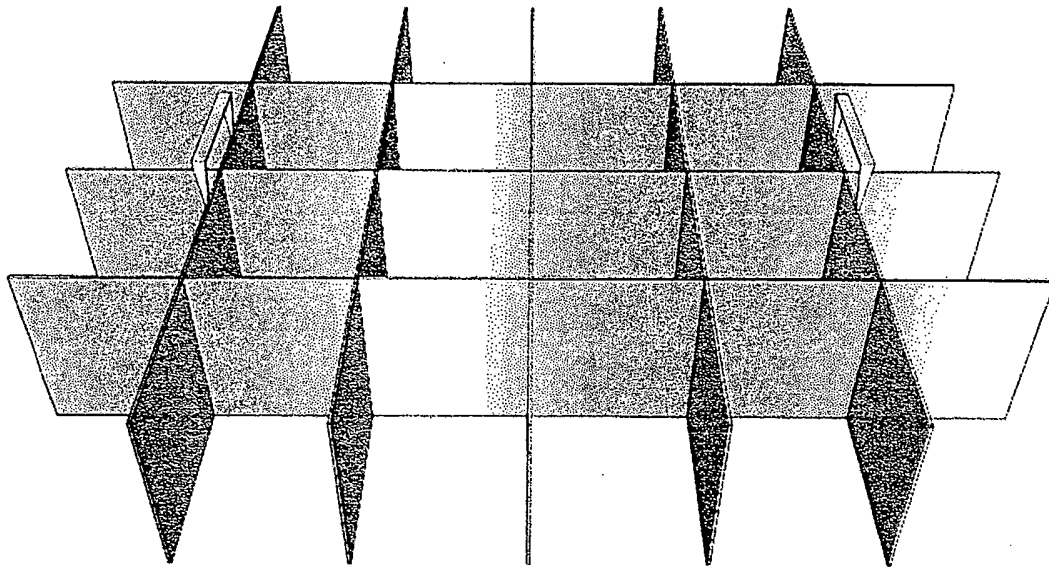


FIGURA 4

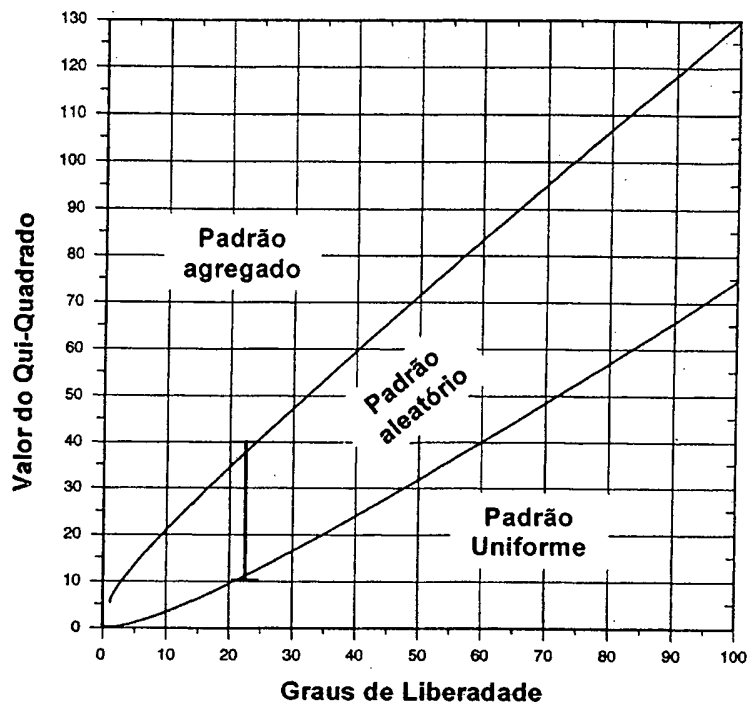


FIGURA 5

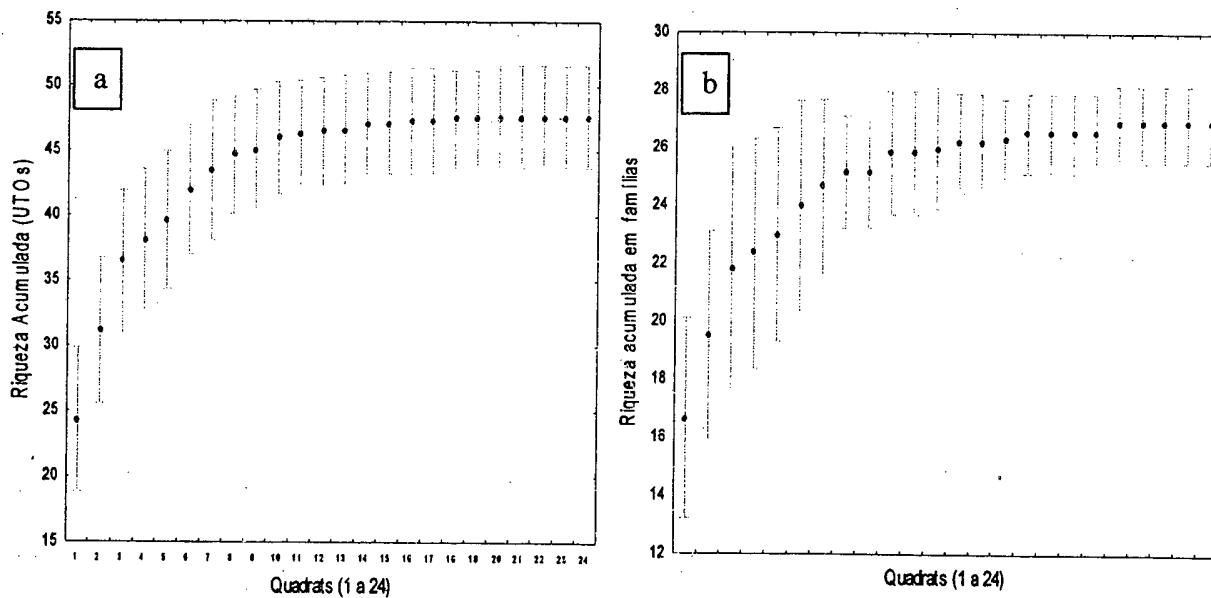


FIGURA 6

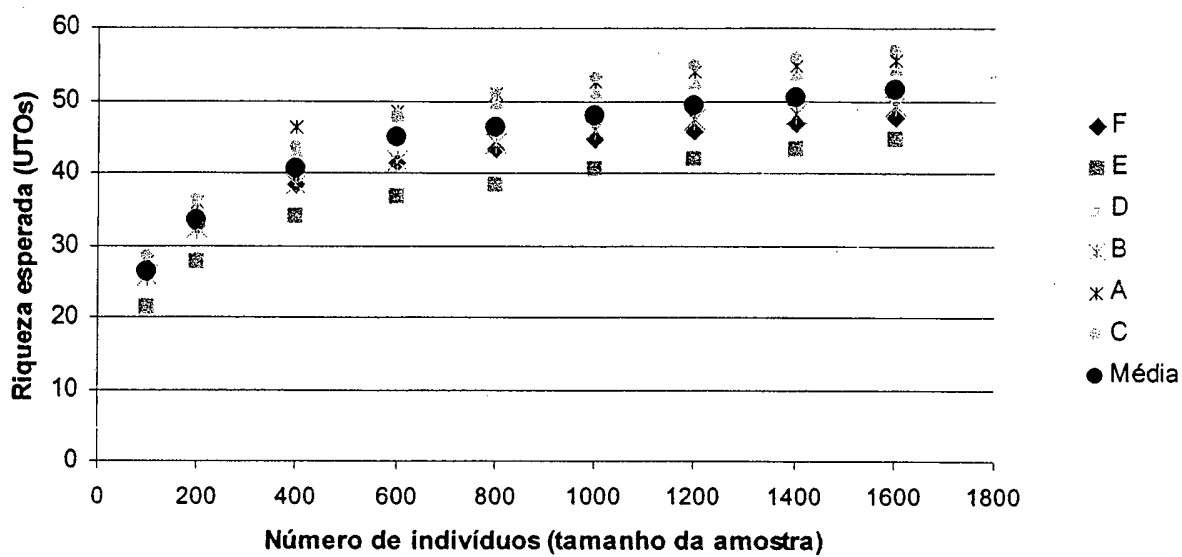
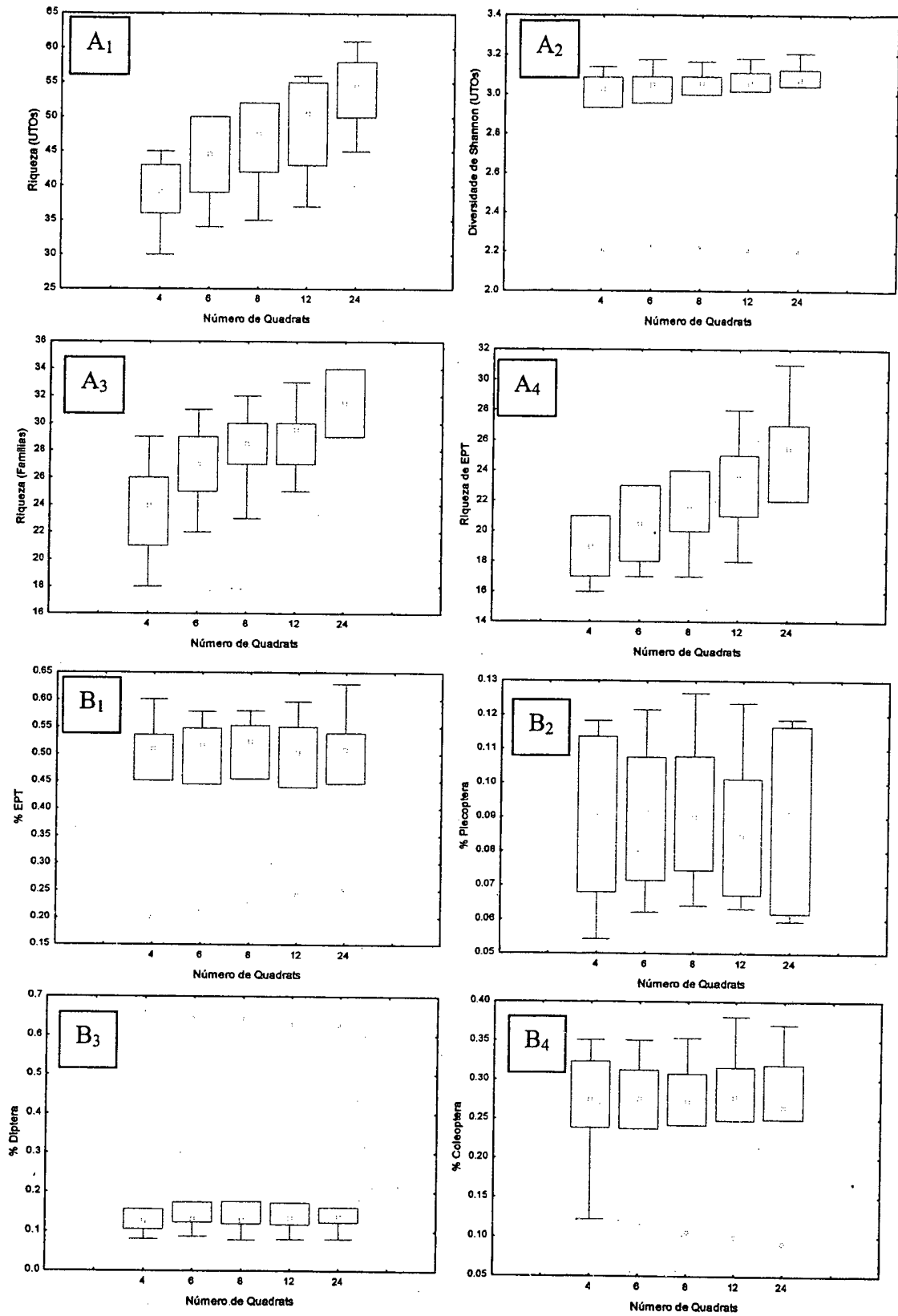


FIGURA 7



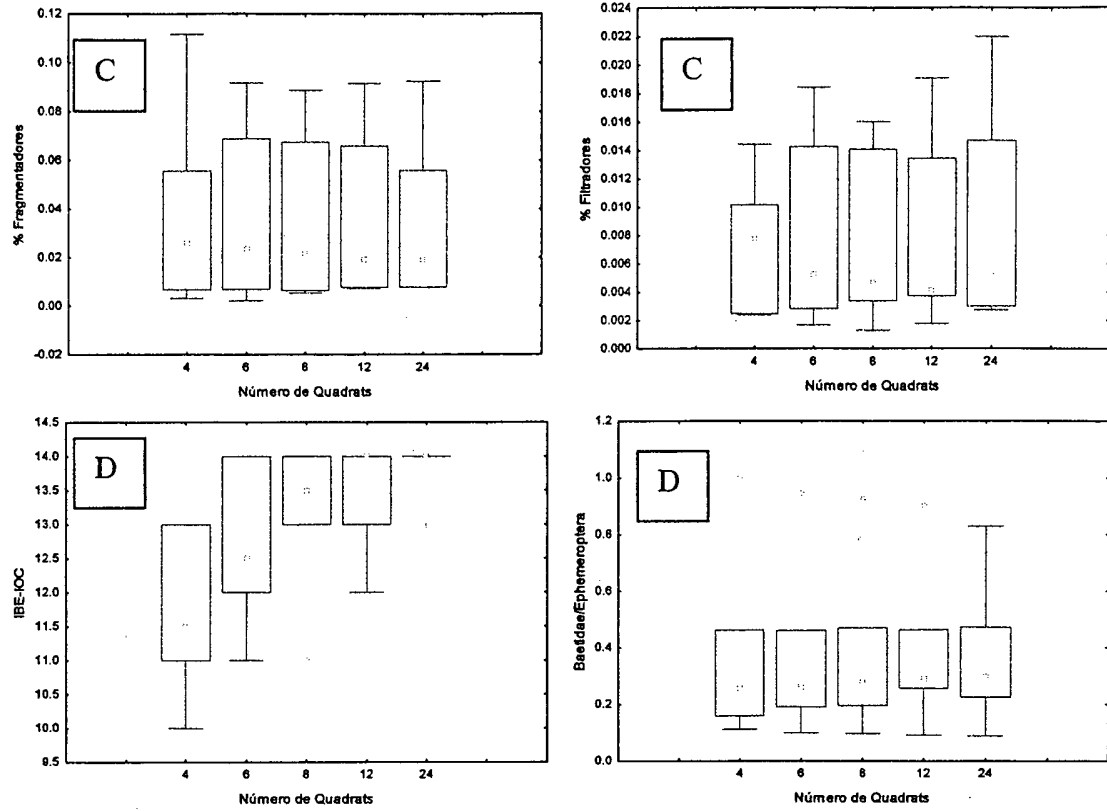


FIGURA 8

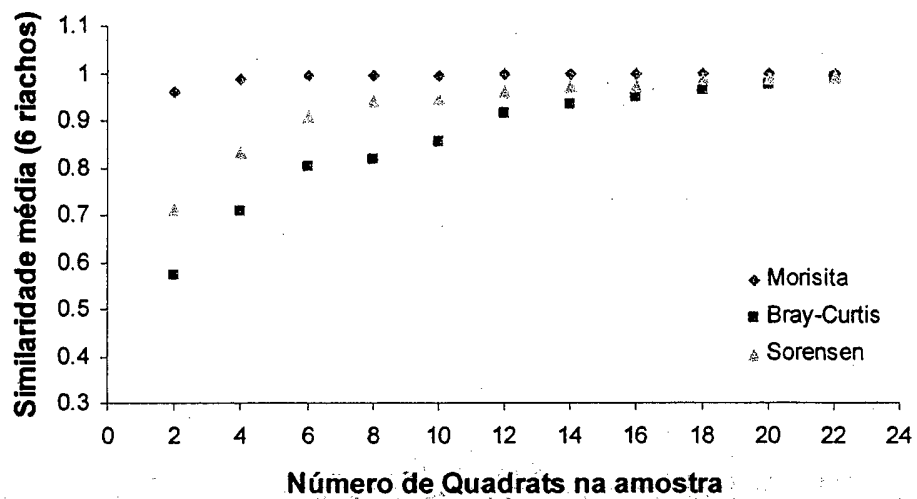


FIGURA 9

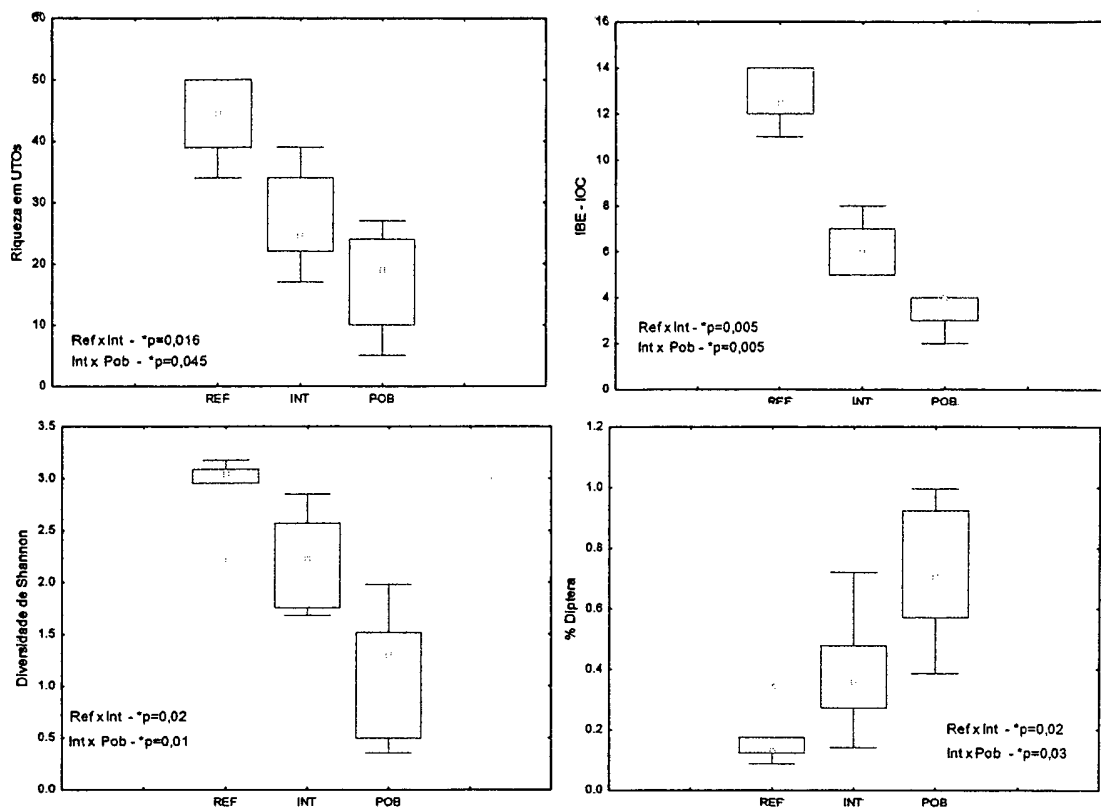


FIGURA 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2011/000144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01M23/02 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01M23/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IE 990858 A2 (KERNAN PATRICK [IE]) 18 April 2001 (2001-04-18)	**
A	----- US 6442889 B I 03 September 2002 (2002-09-03) -----	**

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2011

Date of mailing of the international search report

30.08.2011

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Rua Mayrink Veiga nº 9, 18º andar
 cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ
 +55 21 3037-3663

Facsimile No.

Authorized officer

Carlos Vinícius Garcia Barreto

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR2011/000144

IE 990858 A2

2001-04-18

NONE

US 6442889 B1

2002-09-03

NONE

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000144

<p>A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO</p> <p>A01M23/02 (2006.01)</p> <p>De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC</p>											
<p>B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA</p> <p>Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)</p> <p>A01M23/02</p> <p>Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados</p> <p>Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)</p> <p>EPODOC</p>											
<p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoria*</th> <th>Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado</th> <th>Relevante para as reivindicações Nº</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>IE 990858 A2 (KERNAN PATRICK [IE]) 18 abril 2001 (2001-04-18)</td> <td>**</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6442889 B1 03 setembro 2002 (2002-09-03)</td> <td>**</td> </tr> </tbody> </table>			Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº	A	IE 990858 A2 (KERNAN PATRICK [IE]) 18 abril 2001 (2001-04-18)	**	A	US 6442889 B1 03 setembro 2002 (2002-09-03)	**
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº									
A	IE 990858 A2 (KERNAN PATRICK [IE]) 18 abril 2001 (2001-04-18)	**									
A	US 6442889 B1 03 setembro 2002 (2002-09-03)	**									
<p><input type="checkbox"/> Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C <input checked="" type="checkbox"/> Ver o anexo de famílias das patentes</p>											
<p>* Categorias especiais dos documentos citados:</p> <p>"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.</p> <p>"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional</p> <p>"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial</p> <p>"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.</p> <p>"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.</p> <p>"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.</p> <p>"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.</p> <p>"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.</p> <p>"&" documento membro da mesma família de patentes.</p>											
<p>Data da conclusão da pesquisa internacional</p> <p>16 agosto 2011</p>		<p>Data do envio do relatório de pesquisa internacional:</p> <p>300811</p>									
<p>Nome e endereço postal da ISA/BR</p> <p>INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Marink Veiga nº 9, 18º andar cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ Nº de fax: +55 21 3037-3663</p>		<p>Funcionário autorizado</p> <p>Carlos Vinícius Garcia Barreto Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742</p>									

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2011/000144

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
IE 990858 A2 -----	2001-04-18 -----	Nenhum -----	-----
US 6442889 B1 -----	2002-09-03 -----	Nenhum -----	-----