

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA  
LABORATÓRIO DE CULTIVO E ECOTOXICOLOGIA

**DELOAR DUDA DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO COPÉPODO *TISBE*  
*BIMINIENSIS* PARA TESTES TOXICOLÓGICOS EM ÁGUA E  
SEDIMENTOS ESTUARINOS.**

Orientadora; Lília Pereira de Souza Santos  
Co-orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

**Recife, 2011**

**MESTRADO EM OCEANOGRAFIA**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO COPÉPODO *TISBE*  
*BIMINIENSIS* PARA TESTES TOXICOLÓGICOS EM ÁGUA E  
SEDIMENTOS ESTUARINOS.**

DELOAR DUDA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Orientadora: Lília Pereira de Souza Santos

Co-orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

Recife, 2011

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- O48a Oliveira, Deloar Duda de.  
Avaliação da sensibilidade do copépodo *Tisbe biminiensis* para testes toxicológicos em água e sedimentos estuarinos / Deloar Duda de Oliveira. - Recife: O Autor, 2011.  
77 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lília Pereira de Souza Santos.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2011.  
Inclui Referências Bibliográficas.
1. Oceanografia. 2. Ouriço. 3. *Lytechinus variegatus*. 4. *Tisbe biminiensis*. 5. *Nitokra sp.* I. Santos, Lília Pereira de Souza (Orientadora). II. Abessa, Denis Moledo de Souza (Co-Orientador). III. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.)

BCTG/2011-203

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO COPÉPODO *TISBE BIMINIENSIS*  
PARA TESTES TOXICOLÓGICOS EM ÁGUA E SEDIMENTOS ESTUARINOS**

Deloar Duda de Oliveira

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lília Pereira de Souza Santos  
(Orientadora Presidente da Banca)

---

Dr<sup>a</sup> Cristiane Maria Varela de Araújo Castro

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Paulo Sérgio Martins de Carvalho  
(Universidade Federal de Pernambuco)

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Mário Takayuki Kato  
(Universidade Federal de Pernambuco)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monica Ferreira Costa  
(Universidade Federal de Pernambuco)

Recife, 2011

## **Let it be (John Lennon and Paul McCartney)**

When I find myself in times of trouble  
Mother Mary comes to me  
Speaking words of wisdom, let it be...  
And in my hours of darkness  
She standing right in front of me  
Speaking words of wisdom, let it be...  
Let it be, let it be, let it be, let it be  
Whisper words of wisdom, let it be...

And when the broken hearted people  
Living in the world agree  
There will be an answer, let it be...  
For though they may be parted  
There is still a chance that they will see  
There will be an answer let it be...  
Let it be, let it be, let it be, let it be  
There will be an answer, let it be...

Let it be, let it be, let it be, let it be  
Whisper words of wisdom, let it be...

Let it be, let it be, let it be, let it be  
Whisper words of wisdom, let it be...  
And when the night is cloudy  
There's still a light that shines on me  
Shine until tomorrow, let it be...  
I wake up to the sound of music  
Mother Mary comes to me  
Speaking words of wisdom, let it be...  
Let it be, let it be, let it be, let it be  
There will be an answer, let it be...  
Let it be, let it be, let it be, let it be  
Whisper words of wisdom, let it be...

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a  
minha avó Maria José, que  
sempre me disse palavras doces  
nos momentos de maior  
aflição.

## AGRADECIMENTOS

Bom gostaria de começar agradecendo a Deus por ter me concedido saúde e força durante estes 24 meses para desenvolver esta Dissertação. Não foi fácil, e se tivesse sido talvez não fosse tão importante.

À minha orientadora Lília que nos momentos mais difíceis soube me transmitir palavras de carinho e conforto. E também me ajudou muito no meu amadurecimento profissional e pessoal durante todo o processo.

Ao meu co-orientador Denis que me recebeu tão bem em seu laboratório e me proporcionou aprendizado técnico e pessoal durante o período de estágio na UNESP/SV – SP.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, que cedeu suas instalações para que a dissertação fosse desenvolvida.

À FACEPE pelos 2 anos de bolsa concedidos e por também conceder o auxílio para o estágio na UNESP/SV-SP.

À Jackson técnico que ajudou nas coletas em Santos e Carol por me deixar realizar a coleta junto com as observações de quelônios na área portuária de Santos. Aos alunos do professor Edimilson que ajudaram na coleta de sedimento em Suape.

À toda minha família pelo apoio, por saberem compreender os momentos de ausência, por aturarem todos os momentos de stress e por me amarem. Afinal de contas, não é fácil aguentar os altos níveis de stress proporcionado durante todo o processo. Nossa família passou por algumas mudanças, no entanto, estas nos deixaram ainda mais unidos. AMO vocês!!

À equipe de ecotoxicologia do LACE que me ajudou na realização dos experimentos, bem como nas contagens e que viram de perto cada erro e cada acerto. Bruno, Ari, Bia, Cris, sem a ajuda e a torcida de vocês não seria possível.

À todos os meus queridos integrantes do LACE, tenho orgulho de dizer que faço parte de um laboratório onde as pessoas trabalham animadas.

À equipe de ecotox do NEPEA – UNESP/SV que me recebeu tão bem e que me ajudou nos experimentos Tchuca (Marcela), Malária (Giuliana), Lucas, Daku (Renan), Boto, Baiana (Tainá), Marina da Unisanta. Vocês fizeram meu estagio em São Viselva ser bem alegre e divertido.

Às meninas da república Michele, Flora, Gabriela.

À Sarah que fez estágio comigo no NEPEA.

À Luciara da FURG que nos últimos 2 anos tem me ajudado a entender um pouco mais sobre os Nitokras.

Aos meus amigos Debora, Rui, Rodrigo (Toquinho), Rafael Botelho, João Raphael, Silvia, Felipe, Ana Virgínia, Danielle, Álvaro Rafael, Pedro Henrique, Catarina, Adriana, Lucyana, Rogério que sempre estiveram dispostos a me ouvir mesmo sem entender nada do que eu estava falando, afinal entender ecotox não é simples.

Agradeço de coração a cada um de vocês.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Comparação da toxicidade entre *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp nos parâmetros analisados quando expostos aos sedimentos do complexo Estuarino de Santos e São Vicente - SP.....64
- Tabela 2:** Comparação da toxicidade entre *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp nos parâmetros analisados quando expostos aos sedimentos do Sistema Estuarino de Suape – PE.....65
- Tabela 3:** Comparação da toxicidade entre *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp nos parâmetros analisados quando expostos aos sedimentos da Ilha de Deus , Parque dos Manguezais - PE.....65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização dos pontos de amostragem de água superficial no Complexo Estuarino de Suape - PE.....26
- Figura 2:** Sistema criado para eclosão de prole de copépodos.....28
- Figura 3:** Percentual de pluteus de *Lytechinus variegatus* bem formados em abril de 2009 quando expostos as amostras de água superficial do complexo estuarino de Suape. As letras significam as diferenças estatísticas encontradas pelo teste de Dunnett.....30
- Figura 4:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortos respectivamente de juvenis do copépodo *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape - PE. O asterisco representa a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.....31
- Figura 5:** Percentual médio de pluteus bem formados de *Lytechinus variegatus* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE de outubro de 2009. Os asteriscos mostram as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.....32
- Figura 6:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortalidade de juvenis de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE em outubro de 2009. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.....33
- Figura 7:** Percentual médio de pluteus de *Lytechinus variegatus* bem formados ao término do teste com as amostras coletadas no Sistema Estuarino de Suape – PE em dezembro de 2009. Os asteriscos indicam as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.....34
- Figura 8:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortalidade de juvenis de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do

|  |    |
|--|----|
| Sistema Estuarino de Suape – PE em dezembro de 2009. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.....  | 35 |
| <b>Figura 9:</b> Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortalidade de juvenis de <i>Tisbe biminiensis</i> ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE em fevereiro de 2010. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett..... | 36 |
| <b>Figura 10:</b> Localização dos locais de coleta de sedimento no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente – SP.....   | 46 |
| <b>Figura 11:</b> Localização dos pontos de amostragem de sedimento no Sistema Estuarino de Suape – PE.....  | 47 |
| <b>Figura 12:</b> Localização do ponto de amostragem de sedimento no Parque dos Manguezais.....  | 48 |
| <b>Figura 13:</b> Localização do ponto de amostragem do sedimento controle no manguezal da praia de Maracaípe, Ipojuca – PE.....   | 49 |
| <b>Figura 14:</b> Percentual médio de <i>Tiburonella viscana</i> vivos ao término do experimento.....  | 54 |
| <b>Figura 15:</b> Percentual de fêmeas de <i>Tisbe biminiensis</i> vivas ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP. O asterisco representa a diferença encontrada pelo teste de Dunnett.....   | 55 |
| <b>Figura 16:</b> Fecundidade Total (náuplios + copepoditos) de <i>Tisbe biminiensis</i> ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP.....  | 56 |
| <b>Figura 17:</b> Taxa de Eclosão (Fecundidade/sobrevivência) de <i>Tisbe biminiensis</i> ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP.....   | 56 |

- Figura 18:** Percentual de sobrevivência de fêmeas de *Nitokra* sp vivas ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente – SP.....57
- Figura 19:** Fecundidade total (náuplios + copepoditos) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP. Os asteriscos representam as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.....57
- Figura 20:** Taxa de eclosão (Fecundidade/sobrevivência) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente – S. Os asteriscos são as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.....58
- Figura 21:** Percentual de sobrevivência de fêmeas de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape – PE.....59
- Figura 22:** Fecundidade total (náuplios+copepoditos) de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape. Os asteriscos representam as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.....59
- Figura 23:** Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE. O asterisco representa a diferença encontrada pelo teste de Dunnett..60
- Figura 24:** Percentual de sobrevivência das fêmeas de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE.....61
- Figura 25:** Fecundidade total (náuplios+copepoditos) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE. Os asteriscos representam as diferenças encontradas pelo teste de Dunnett.....61
- Figura 26:** Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape. Os asteriscos representam as diferenças encontradas pelo teste de Dunnett....62

**Figura 27:** a – Percentual de fêmeas de vivas, b- Fecundidade total (náuplios + copepoditos) e c- Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) de *Tisbe biminiensis* ao término dos experimentos com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada no teste “t” .....63

**Figura 28:** a – Percentual de fêmeas de vivas, b- Fecundidade total (náuplios + copepoditos) média e c- Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) média de *Nitokra sp* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada no teste “t” .....64

## RESUMO GERAL

Testes de toxicidade são uma ferramenta efetiva na análise da qualidade de água e sedimentos marinhos e estuarinos. O ouriço do mar *Lytechinus variegatus* é um dos organismos mais utilizado de toxicidade da água, no entanto, ao longo da costa nordestina as populações encontram-se reduzidas e o desenvolvimento de um modelo biológico sensível para a avaliação ecotoxicológica da água faz-se necessário. O teste crônico com náuplios de *Tisbe biminiensis* consiste na exposição dos náuplios durante 48h ou até que 50% dos indivíduos do controle sejam copepoditos. As amostras ambientais utilizadas nos testes foram coletas no Complexo Estuarino de Suape em 5 diferentes pontos . Já para os testes com sedimentos com a finalidade de observar se há diferença entre os copépodos *T. biminiensis* e *Nitokra sp* quando expostas aos mesmos sedimentos, foram escolhidos 3 locais com toxicidade anteriormente comprovada, são eles: os Complexos estuarinos de Santos e São Vicente (Alemoa, Cosipa/Usiminas, Marina e Mariana), Suape e Parque dos Manguezais (Ilha de Deus).. De modo geral os náuplios de *T. biminiensis* demonstraram o mesmo padrão de resposta dos ouriços e em algumas ocasiões uma maior sensibilidade. Já para os testes com sedimento também foi observado quem os copépodos apresentam padrão de sensibilidade semelhante e em alguns experimentos *Nitokra sp* demonstrou maior sensibilidade ao sedimento exposto. Logo, náuplios do copépodo *T. biminiensis* podem ser utilizados com sucesso na avaliação da toxicidade de amostras ambientais de água do mar/estuarinas. E testes com os copépodos *T. biminiensis* e *Nitokra sp* mostram um padrão de sensibilidade relativamente semelhante

**Palavras chave:** ouriço, *Lytechinus variegatus*, *Tisbe biminiensis*, *Nitokra sp*

## ABSTRACT

Toxicity tests are an effective tool in analyzing the water and sediment quality. The sea urchin *Lytechinus variegatus* is one of the most used test organism of water toxicity, however, along the northeastern coast populations are reduced and the development of a sensitive biological model for ecotoxicological evaluation of water is necessary. The chronic test with *Tisbe biminiensis* nauplii consist in the exposition of nauplii for 48 hours (or until 50% of control individuals are copepodites) to water samples. Environmental samples used in this study were collected in the Estuarine Systems of Suape in five different stations. For the tests with sediment in order to observe if there is any difference between the copepod *T. biminiensis* and *Nitokra* sp when exposed to the same sediment, three locations were chosen where sediment toxicity was previously detected, they are: estuarine systems of Santos and Sao Vicente (Alemoa, Cosipa / Usiminas, Marina and Mariana), Suape and Parque dos Manguezais (Ilha de Deus, Pina).. In general the nauplii of *T. biminiensis* demonstrated the same response patterns of sea urchins and sometimes a higher sensitivity. For the tests with sediment was also observed that copepods have similar pattern of sensitivity and in some experiments *Nitokra* sp showed greater sensitivity to the exposed sediment. Thus, the copepod nauplii *T. biminiensis* can be used successfully to evaluate the toxicity of environmental samples of seawater. The copepods *T. biminiensis* and *Nitokra* sp show a quite similar sensitivity.

**Key words:** sea urchin, *Lytechinus variegatus*, *Tisbe biminiensis*, *Nitokra* sp

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL: .....  | 17 |
| CAPÍTULO I .....   | 21 |
| RESUMO .....   | 23 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 24 |
| 1.2 METODOLOGIA .....  | 25 |
| 1.2.1 Área de Estudo .....   | 25 |
| 1.2.2 Coleta, armazenamento e degelo das amostras: .....   | 26 |
| 1.2.3 Teste com o ouriço <i>Lytechinus variegatus</i> .....  | 27 |
| 1.2.4 Teste de toxicidade da água com náuplios de <i>Tisbe Biminiensis</i> em placa 96 poços ..... | 28 |
| 1.2.5 Análise estatística .....  | 29 |
| 1.3. RESULTADOS .....  | 30 |
| 1.3.1 Abril 2009 .....   | 30 |
| 1.3.2 Outubro 2009 .....   | 31 |
| 1.3.3 Dezembro 2009 .....  | 33 |
| 1.3.4 Fevereiro 2010 .....   | 35 |
| 1.4. DISCUSSÃO .....   | 36 |
| 1.5. CONCLUSÃO .....   | 39 |
| CAPÍTULO II .....  | 40 |
| RESUMO .....   | 42 |
| 2.1 INTRODUÇÃO .....   | 43 |
| 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 45 |
| 2.2.1 Áreas de Estudo .....  | 45 |
| 2.2.2 Coleta das amostras de sedimento .....   | 48 |
| 2.2.3 Coleta do sedimento controle .....   | 48 |
| 2.2.4 Testes de toxicidade com <i>Tiburonella viscana</i> .....                                    | 49 |
| 2.2.5 Teste de toxicidade com <i>Tisbe biminiensis</i> .....                                       | 51 |
| 2.2.6 Teste de toxicidade com <i>Nitokra</i> sp. ....  | 52 |
| 2.2.7 Teste com substância de referência .....   | 53 |
| 2.2.9 Análise dos dados .....  | 53 |
| 2.3 RESULTADOS .....   | 54 |
| 2.3.1 Sistema Estuarino de Santos e São Vicente .....  | 54 |
| 2.3.2 Sistema Estuarino de Suape .....   | 58 |
| 2.3.3 Pina .....   | 62 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 2.4 DISCUSSÃO .....                | 64 |
| 2.5 CONCLUSÃO .....                | 70 |
| 2.6 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA ..... | 71 |

## **INTRODUÇÃO GERAL:**

Nos dois últimos séculos um modelo de civilização foi imposto, com ele veio a industrialização, e atrelado a ela uma grande diversidade de produtos químicos, estes potencialmente tóxicos. A poluição só se tornou evidente com o aumento populacional, no entanto, foi apenas em 1960 que a preocupação com a poluição passou a ser internacionalmente reconhecida, devido aos problemas causados ao homem e ao ambiente (Zagatto, 2006).

Os ambientes estuarinos e oceânicos estão sujeitos a uma ampla variedade de impactos antropogênicos associados com o desenvolvimento da zona costeira, a entrada de poluentes, a sobreexploração dos recursos marinhos, a geração de energia elétrica, maricultura, transporte e muitas outras atividades (Goldberg, 1995; Kennish, 2007). Estes são responsáveis por impactos ecológicos importantes e prejuízos econômicos em todo o mundo (Whitemarsh, 1999). Os estuários e águas marinhas costeiras continuam a ser os sistemas mais ameaçados, devido em grande parte ao crescimento da população humana residente nas bacias hidrográficas vizinhas e o aumento da utilização dos recursos costeiros.

O interesse pelas questões ambientais vem aumentando gradativamente nas últimas décadas, principalmente devido aos inúmeros acidentes com substâncias químicas. Foi a partir desses acidentes que vários países começaram a monitorar e avaliar o nível de contaminação dessas substâncias químicas no ambiente. Com a ocorrência de todos esses fatos, foi possível constatar que o ambiente aquático não é um compartimento de diluição infinita da poluição gerada (Zagatto, 2006).

A Ecotoxicologia é a integração da ecologia e da toxicologia (Chapman, 1995; Baird *et al.*, 1996) e seu objetivo é compreender e prever os efeitos biológicos de

substâncias químicas e/ou a exposição em condições reais nas comunidades naturais. Desta forma, conhecimentos teóricos e métodos oriundos da ecologia são necessários para alcançar este objetivo (Chapman, 2002).

Os primeiros registros de testes de toxicidade com organismos aquáticos datam de 1920, sendo os peixes utilizados primeiramente. Nas décadas seguintes, 1940 e 1950, os trabalhos na área foram aumentando e outros métodos foram surgindo e as diferenças nas condições experimentais foram aparecendo, e com ela a constatação de que os testes precisavam ser padronizados.

Atualmente, vários testes de toxicidade já se encontram padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações, como Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Work Association (AWWA), Deutsches Institut für Normung (DIN), International Organization for Standardization (ISO) e Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) (Aragão & Araújo, 2006).

Em ecotoxicologia várias espécies de organismos são utilizadas em testes de toxicidade tais como as microalgas *Pseudokirchneriella subcapta*, *Desmodesmus subspicatus* e *Navicula pelliculosa* (OECD, 2006); a macroalga *Champia parvula* (Maurat, 1996), os moluscos como a ostra *Crassostrea rhizophorae* (Nascimento, 2002) e *Crassostrea gigas*, o ouriço *Lytechinus variegatus* (Nipper *et al.*, 1993; Zamboni, 1993; Rachid, 1996; Mastroti, 1997), os misidáceos *Mysidopsis bahia* (Weber *et al.*, 1988; Weber, 1991; Klemm *et al.*, 1994), *M. juniae* (Prósperi *et al.*, 1994, 1998) e *M. elongata atlantica* (Gama & Zamboni, 1999), o tanaidáceo *Kalliapseudes schubarti* (Zamboni & Costa, 2002), os anfípodos *Hyalella azteca* (Zamboni, 2000), *Tiburonella viscana* (Mello & Abessa, 2002), e os copépodos *Tigriopus japonicus* (Kwok *et al.*,

2008), *Nitocra spinipis* (Williams & Jones, 1994), *Amphiascus tenuiremis* (ASTM – 2004), *Tisbe battagliai* (Williams, 1992; Williams *et al.*, 1993; Bechmann, 1994, 1999; Hutchinson *et al.*, 1999a,b; Barata *et al.*, 2002), *Microarthridion littorale* (Wulff, 1972), entre outros.

O método mais utilizado na avaliação da toxicidade da água do mar é o teste com embriões de ouriços-do-mar, pois este possui norma da CETESB desde 1992, adotada nacionalmente e uma norma técnica da ABNT (2006). A espécie mais utilizada no Brasil para o teste é o ouriço-roxo *Lytechinus variegatus* (Lamarck 1816). Os ouriços são organismos importantes, pois esta espécie tem grande importância ecológica, isso devido a sua grande distribuição geográfica e abundância, tornando-a ideal para a avaliação ecotoxicológica (Böttger *et al.*, 2001)

Segundo Coull & Chandler (1992) copépodos harpacticóides são bastante sensíveis e adequados para testes de toxicidade. Eles têm uma importante e significativa função na cadeia alimentar formando um elo indispensável entre os produtores primários e os consumidores secundários em muitos ecossistemas aquáticos (Coull, 1990). O tamanho reduzido destes indivíduos facilita a realização dos testes, diminuindo o custo, e seu hábito epibentônico possibilita testar poluentes tanto na fase aquosa quanto aqueles ligados ao sedimento (Bengtsson, 1978; Hutchison *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000).

O uso potencial de copépodos como organismo modelo em ecotoxicologia tem sido reconhecido há algum tempo. Em alguns países, vêm sendo utilizados regularmente copépodos marinhos em bioensaios de toxicidade (por exemplo, Reino Unido; EDMAR, 2002). A norma da International Standardization Organization - ISO 14669 (1999) apresenta um procedimento metodológico para determinação da toxicidade aguda utilizando 3 diferentes espécies de copépodos marinhos em diferentes estágios do

ciclo de vida. Há também uma padronização recente que testa o ciclo de vida completo do copépodo *Amphiascus tenuiremis* em microplaca (ASTM E-2317-04).

Os copépodos do gênero *Tisbe* (Copepoda: Harpacticoida) são organismos adequados para avaliação do risco ambiental, pois são sensíveis a contaminantes, apresentam ampla distribuição geográfica, importância ecológica elevada, ciclo de vida curto, e animais com estágios de vida variados podem ser obtidos de cultivos a qualquer época do ano. Além disso, requerem espaço mínimo e equipamentos para testes, e são fáceis de cultivar em laboratório (Williams, 1992; Williams & Jones, 1994; Kusk & Wollenberger, 2007).

O copépodo *Tisbe biminiensis* Volkman-Rocco 1973 vem sendo cultivado desde 1998 no Departamento de Oceanografia, e, desde 2003, esta espécie tem sido usada com sucesso na avaliação da toxicidade de sedimentos (Araújo-Castro, 2008). Já uma espécie nova do gênero *Nitokra* foi avaliada pelo grupo de pesquisa de ecotoxicologia do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (Lotufo & Abessa, 2002) e vem sendo usada na avaliação da toxicidade de sedimentos estuarinos, não só por esse grupo, mas também por pesquisadores de outros centros de pesquisa de São Paulo (UNESP) e de outros estados (CEM-UFPR, FURG-RS, e LABOMAR-UFC, entre outros).

Os objetivos deste trabalho são 1- testar a sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* quando expostos a amostras ambientais, comparando os resultados obtidos com aqueles observados no teste embriolarval com *L. variegatus* e 2- comparar a sensibilidade de fêmeas de *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp. expostas a sedimentos estuarinos com toxicidade anteriormente observada.

## **CAPÍTULO I**

**Desenvolvimento de protocolo para utilização de náuplios do copépodo *Tisbe biminiensis* em testes de toxicidade de água marinha e estuarina**

## RESUMO

Os testes de avaliação da toxicidade da água são utilizados mundialmente como uma ferramenta de monitoramento ambiental. O ouriço do mar *Lytechinus variegatus* é um dos organismos mais utilizados, pois são sensíveis, fáceis de coletar e os resultados obtidos são facilmente observáveis. No entanto, ao longo da costa nordestina *L. variegatus* encontra-se com populações reduzidas e o desenvolvimento de um modelo biológico sensível para a avaliação ecotoxicológica da água faz-se necessário. O teste crônico aqui proposto consiste na exposição de náuplios de *Tisbe biminiensis* com 24h de eclosão em placas de 96 poços até o estágio de copepoditos. Para cada amostra e controle são feitas 3 réplicas, cada uma contendo 30 náuplios. A duração do teste é de 48h ou até a formação de 50% de copepoditos no controle. As amostras utilizadas nos testes foram coletas no Complexo Estuarino de Suape em 5 diferentes pontos. Para avaliação deste teste foi aplicado em paralelo o teste embrio-larval com *L. variegatus*. Em abril de 2009 os náuplios de *T. biminiensis* foram tão sensíveis quanto os ouriços, apenas o P2 não apresentou toxicidade. Já em outubro de 2009, P3 e P6 foram tóxicos para os embriões do ouriço *L. variegatus*, enquanto que todos os pontos foram tóxicos para os juvenis de *T. biminiensis*. No mês de dezembro de 2009, P2, P5 e P6 foram tóxicos para os embriões de ouriço, para os juvenis de copépodo apenas o P2 não foi tóxico. E por fim em fevereiro de 2010, devido ao desenvolvimento insatisfatório dos embriões de *L. variegatus* em 28 horas o teste não foi considerado válido. Os resultados obtidos com os náuplios de copépodo mostram P3 e P4 como tóxicos. Os náuplios de *T. biminiensis* podem ser usados sim na avaliação da toxicidade da água, pois não apenas demonstram sensibilidade semelhante à observada no teste com embriões de *L. variegatus*, como em algumas campanhas apresentaram mais sensibilidade. Recomenda-se continuar desenvolvendo o protocolo para que o teste se torne tão simples quanto o do ouriço, porque o tempo gasto na realização do modelo apresentado neste capítulo é muito dispendioso e exige pessoal treinado com bastante destreza.

## 1. 1INTRODUÇÃO

Testes de toxicidade utilizando embriões e larvas de ouriço-do-mar são amplamente utilizados em avaliações ambientais. Estes podem ser empregados na caracterização de amostras de efluentes, águas e sedimentos, dentre elas o elutriado, a água intersticial, a interface sedimento – água (Cesar *et al.*, 2004). Os experimentos realizados com ovos e embriões de equinodermos são aceitos internacionalmente, sendo considerados adequados para avaliar a toxicidade de água do mar (USEPA, 1995; Environment Canada, 1992; CETESB, 1999; Cesar, 2003; ABNT, 2006). Os ouriços são organismos que apresentam grande importância ecológica, além de ampla distribuição geográfica e abundância, tornando-se organismos importantes para a avaliação ecotoxicológica (Böttger & McClintock, 2001). Kobayashi em (1984) já constatava que testes com ouriços são adequados para testes de toxicidade, pois são de fácil realização, curta duração, o teste é sensível, padronizado e preciso.

No entanto, as populações de ouriço da espécie *Lytechinus variegatus* encontram-se em declínio ao longo da costa litorânea brasileira. Tal declínio populacional foi observado primeiramente no Ceará e atualmente acredita-se que já tenha chegado ao litoral Fluminense. Devido a esse desequilíbrio populacional, surgiu a necessidade de desenvolvimento de um novo teste de toxicidade que apresente a mesma eficiência e praticidade observada nos testes com embriões de ouriço.

Copépodos marinhos com hábito bentônico tem sido utilizados com sucesso em testes de ecotoxicidade (Williams, 1992; Chandler & Scott, 1991; Chandler & Green, 2001; Chandler *et al.*, 2004). Os indivíduos do gênero *Tisbe* (Copepoda: Harpacticoida) são organismos adequados na avaliação de risco ambiental, pois eles apresentam ampla distribuição geográfica, tem elevada importância ecológica, seu ciclo de vida é curto, e

os animais em qualquer uma das fases de desenvolvimento podem ser coletados a partir de cultivos, em qualquer época do ano, eles exigem o mínimo de espaço e equipamentos, e estes organismos são fáceis de manter em condições de laboratório (Williams, 1992; Williams & Jones, 1994; Kusk & Wollenberger, 2007). Assim, desde o final da década de 70 os copépodos marinhos são utilizados com sucesso em testes de toxicidade (Kusk & Wollenberger, 2007).

A norma da International Standardization Organization - ISO 14669 (1999) apresenta um protocolo para determinação da toxicidade aguda utilizando 3 diferentes espécies de copépodos marinhos em diferentes estágios do seu ciclo de vida. Há também o protocolo que foi desenvolvido recentemente, o qual testa o ciclo de vida completo do copépodo *Amphiascus tenuiremis* em microplaca de 96 poços (ASTM E-2317-04, 2004).

O copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* (Volkman-Rocco, 1973) vem sendo cultivado desde 1998 no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia do Departamento de Oceanografia, e, desde 2003, esta espécie é empregada em testes de toxicidade com sucesso na avaliação de sedimentos (Araújo-Castro, 2008). Logo, o objetivo deste capítulo é avaliar a sensibilidade dos náuplios de *T. biminiensis* quando expostos a amostras de água superficial, comparando com os resultados obtidos nos testes embriolarvais com *L. variegatus*.

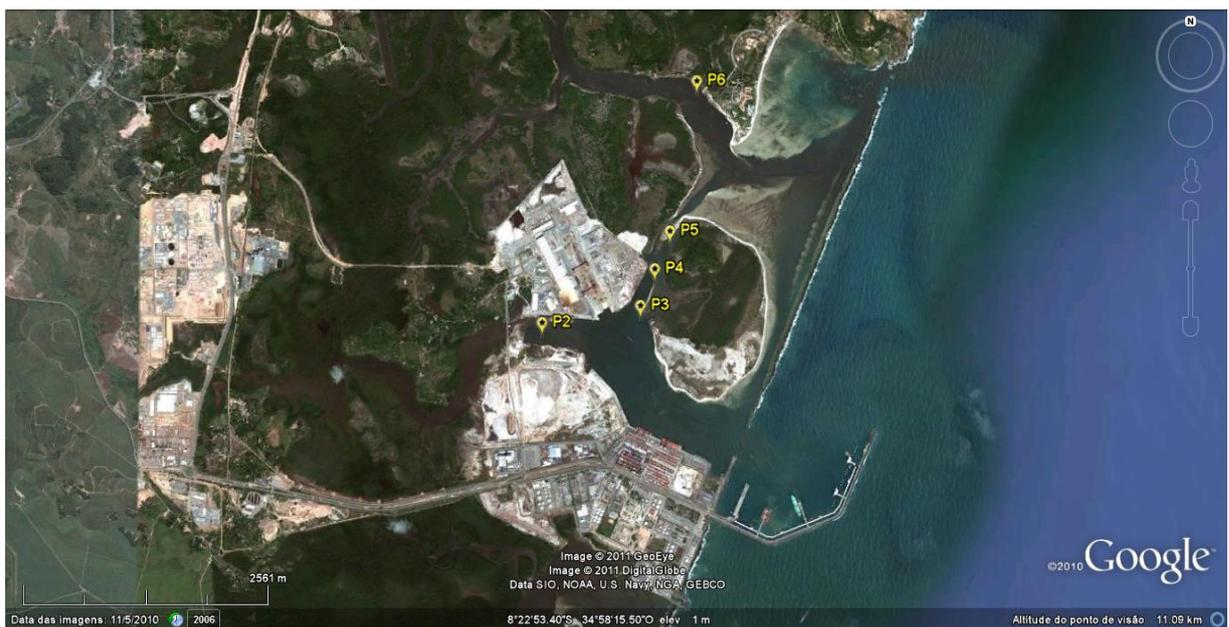
## **1.2 METODOLOGIA**

### **1.2.1 Área de Estudo**

O Sistema Estuarino de Suape está localizado no litoral sul do estado de Pernambuco, é neste sistema que está localizado o Porto de Suape. Este se situa entre os municípios de Ipojuca e Cabo de Santo Agostinho, mais exatamente na Foz do rio

Ipojuca. A construção do Porto de Suape foi prevista para operar produtos combustíveis e cereais a granel, substituindo o Porto do Recife. Hoje o porto é um dos maiores do Brasil e sua área de influência abrange todo o estado de Pernambuco bem como parte dos estados de Alagoas e da Paraíba.

As amostras de água superficial foram coletadas a cada 2 meses no complexo estuarino de Suape entre os anos de 2009 e 2010 em 5 pontos de amostragem: (S 8° 22' 55" – W 46° 58' 38"), P3 (S 8° 22' 50" – W 46° 57' 59"), P4 (S 8° 22' 30" – W 46° 57' 59"), P5 (S 8° 22' 22" – W 46° 57' 51") e P6 (S 8° 21' 36" – W 46° 57' 45"). As coletas foram realizadas preferencialmente nas marés baixas de sizígia, em cinco pontos distintos localizados na área de influência do estaleiro Atlântico Sul (Figura1).



**Figura 1:** Localização dos pontos de amostragem de água superficial no Complexo Estuarino de Suape - PE.

### 1.2.2 Coleta, armazenamento e degelo das amostras:

As amostras de água superficial do Complexo Estuarino de Suape foram coletadas em garrafas de polietileno de 100 mL. De acordo com a ABNT (2006), os recipientes de coleta devem ser totalmente preenchidos, a fim de minimizar a presença de ar nas amostras. Para cada ponto de coleta foram feitas 5 réplicas, após a coleta as amostras foram armazenadas em caixa térmica com gelo para posterior transporte ao laboratório.

Os ensaios de toxicidade devem ser iniciados o mais rápido possível, no entanto, na impossibilidade realização dos ensaios em até 48h, as amostras foram congeladas em *freezer* abaixo de -10°C por um período que não excedeu 60 dias. Nesta situação, foi preciso desprezar uma pequena alíquota da amostra para que o recipiente não se rompesse durante o congelamento (ABNT, 2006).

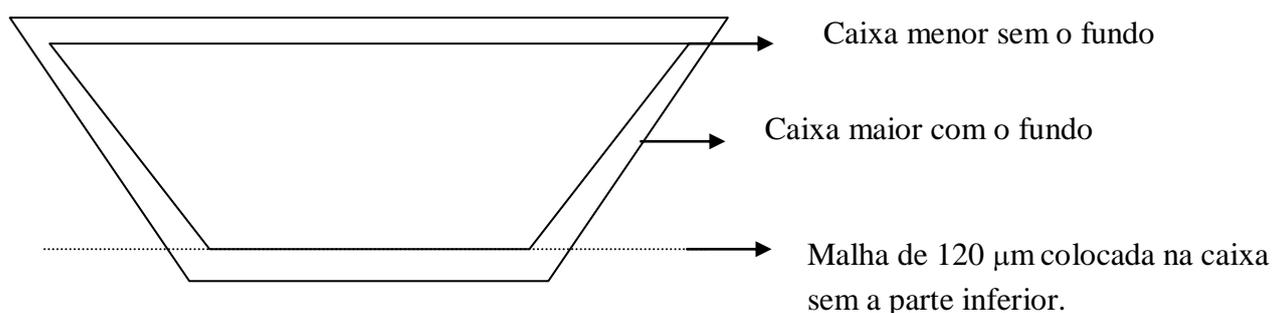
Para a utilização das amostras, o descongelamento das mesmas foi feito em temperatura ambiente ou em geladeira.

### **1.2.3 Teste com o ouriço *Lytechinus variegatus***

Os testes de toxicidade da água realizados com ovos recém fecundados do ouriço *Lytechinus variegatus* foram realizados de acordo com as normas ABNT NBR15350 (2006) e da CETESB (1999). Este é um bioensaio de desenvolvimento embriolarval, onde o parâmetro do teste é o desenvolvimento do ovo para o estágio larval de pluteus. O ensaio é considerado válido quando há formação de pelo menos 80% de pluteus bem formados no controle.

#### 1.2.4 Teste de toxicidade da água com náuplios de *Tisbe Biminiensis* em placa 96 poços

Os testes de toxicidade realizados com náuplios de *Tisbe biminiensis* seguiram a metodologia proposta pela ASTM (American Society for Testing and Materials) (2004) com modificações metodológicas para a espécie testada. Um dia antes do início do teste, fêmeas de *T. biminiensis* foram submetidas a uma estrutura de eclosão de náuplios (Figura 2). Esta é composta por, duas caixas de mesmo tamanho, sendo a caixa superior com a parte inferior substituída por uma malha 120 $\mu$ m de abertura, tamanho suficiente para a passagem dos náuplios recém eclodidos. Já a caixa inferior permaneceu intacta, dentro do sistema e recebeu 30mL de microalga e 4L de água do mar, o sistema permaneceu estagnado até que a microalga adicionada decantasse. Após a decantação da microalga, as fêmeas ovígeras foram adicionadas na caixa superior, permanecendo na estrutura por pelo menos 12h. À medida que os náuplios iam eclodindo, os mesmos passavam pela malha de e ficavam armazenados no fundo, ficando assim separados das fêmeas. Os indivíduos utilizados no teste tinham no máximo 26 horas de eclosão.



**Figura 2:** Sistema criado para eclosão de prole de copéodos.

Cada amostra ambiental de água foi descongelada em refrigerador, a salinidade foi ajustada quando necessário com salmoura de acordo com a faixa de tolerância do

copépodo. A solução a ser testada foi preparada com a amostra em temperatura ambiente e a microalga *Thalassiosira fluviatilis* (diatomácea) com concentração de 0,2 µg Chl-a/mL.

Todas as amostras testadas e controle tiveram 3 réplicas, cada uma delas contendo 30 náuplios. Estes foram colocados individualmente em placas 96 poços com auxílio de uma pipeta Pasteur e a amostra a serem testados, os poços vazios foram preenchidos com água destilada para minimizar a evaporação e evitar que as condições estabelecidas inicialmente variassem. A observação do teste foi realizada a cada 12 horas com estereomicroscópio durante no mínimo por 48 horas, que é o tempo médio de passagem do estágio naupliar para o estágio de copepodito, ou até a formação de pelo menos 50% de copepoditos no controle, aproximadamente 72h. Os parâmetros observados no teste foram: mortalidade, percentual de náuplios e copepoditos.

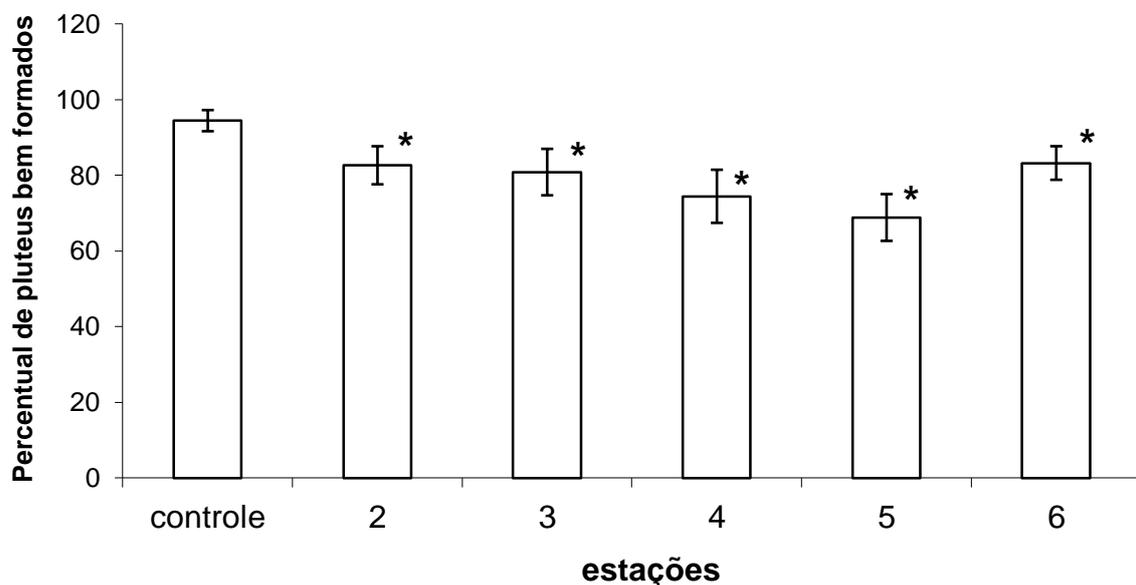
#### **1.2.5 Análise estatística**

O tratamento dos dados obtidos foi realizado primeiramente com a aplicação do teste de normalidade e para testar a homocedasticidade dos dados obtidos com auxílio do teste de Kolmogorov-Sminnov. Sendo os dados normais, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) com nível de significância de 95%. Para o teste com os as larvas de *Lytechinus variegatus* e náuplios de *Tisbe biminiensis* o teste a posteriore de Dunnett foi realizado para encontrar onde ocorreram as diferenças significativas em relação ao controle.

## 1.3. RESULTADOS

### 1.3.1 Abril 2009

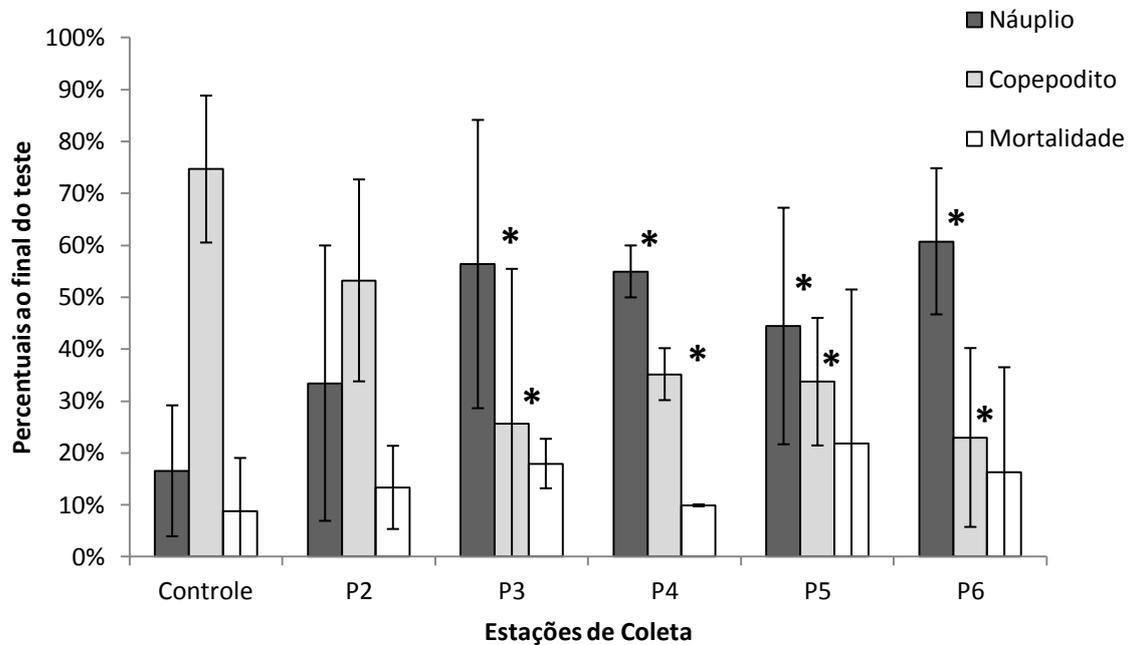
Com base nos dados analisados em abril de 2009 a média de pluteus bem formados foi de 94,4% no controle, e todas as amostras ambientais testadas foram significativamente diferentes e inferiores (ANOVA= 12,78;  $p < 0,0001$ ) (Figura 3).



**Figura 3:** Percentual de pluteus de *Lytechinus variegatus* bem formados em abril de 2009 quando expostos as amostras de água superficial do complexo estuarino de Suape. As letras significam as diferenças estatísticas encontradas pelo teste de Dunnett.

Com relação ao desenvolvimento dos náuplios houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F = 4,282$ ;  $p = 0,013$ ). Os pontos P3, P4, P5 e P6 apresentaram percentual médio de náuplios significativamente superior em relação ao controle. O que caracteriza um retardo no desenvolvimento dos indivíduos. Já para o percentual de copepoditos houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F = 5,778$ ;  $p = 0,004$ ). Os pontos P3, P4, P5 e P6 apresentaram percentual médio inferior quando comparados com o controle. Já para a mortalidade no mesmo

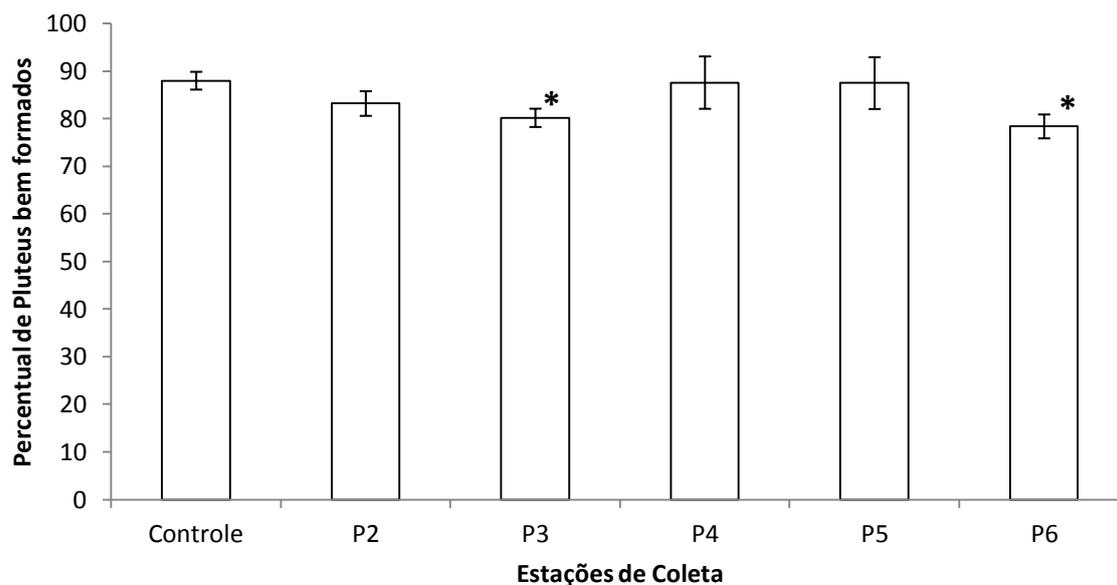
período, não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 0, 618$ ;  $p= 0,688$ ) (Figura 4).



**Figura 4:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortos respectivamente de juvenis do copépodo *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape - PE. O asterisco representa a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.

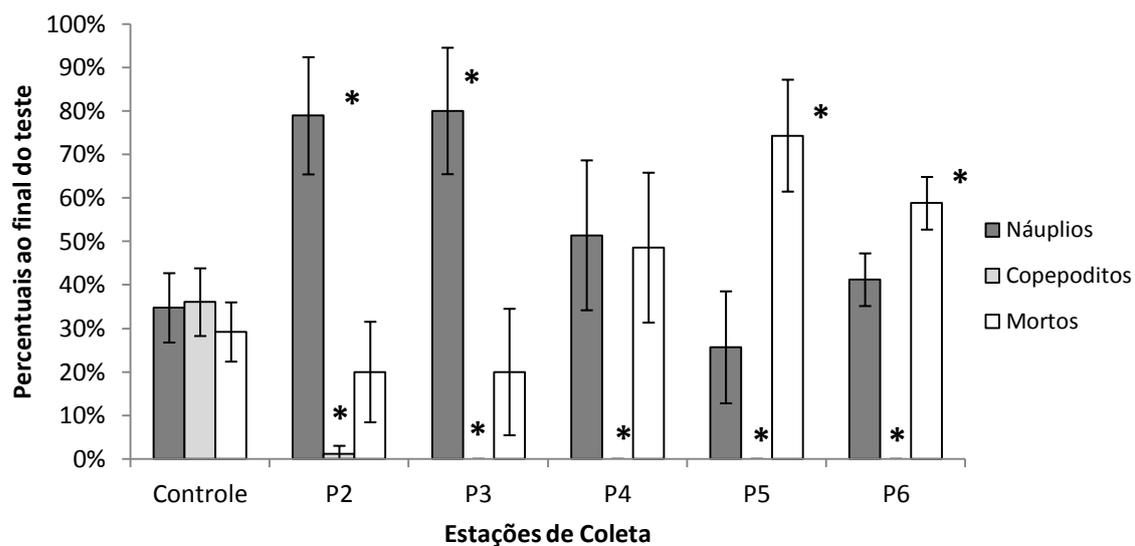
### 1.3.2 Outubro 2009

Nas amostras de outubro de 2009, o percentual de pluteus bem formados foi 88,8% no controle. Neste período apenas as amostras P3 e P6 foram significativamente diferentes e inferiores ao controle (ANOVA  $F=6,73$ ;  $p= <0, 001$ ) (Figura 5).



**Figura 5:** Percentual médio de pluteus bem formados de *Lytechinus variegatus* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE de outubro de 2009. Os asteriscos mostram as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.

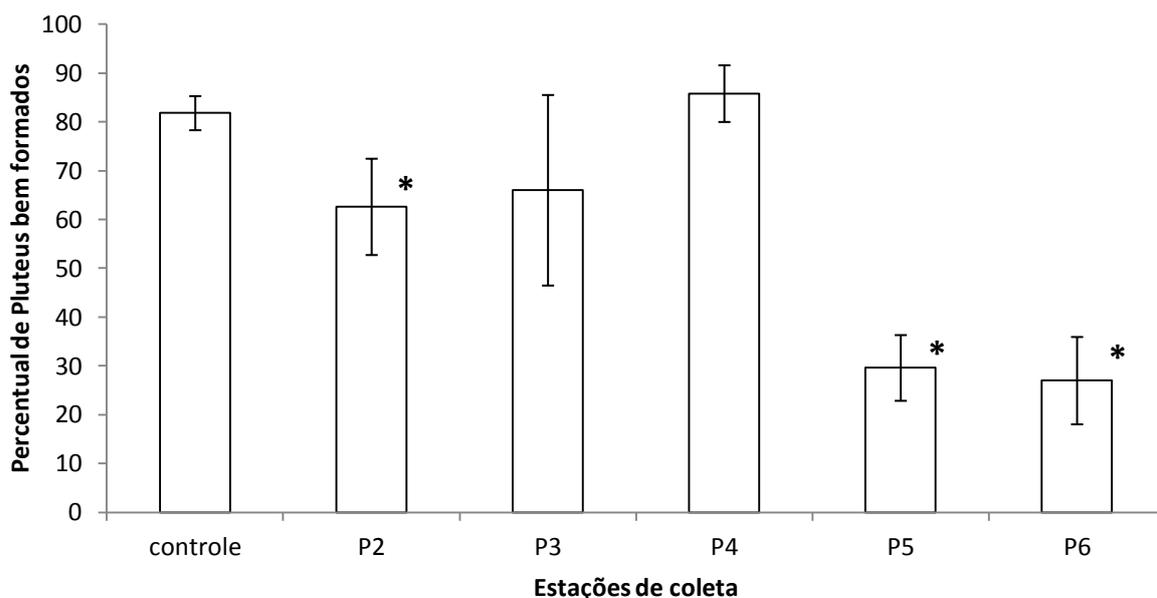
O percentual médio de náuplios ao término do teste apresentou diferença significativa do controle (ANOVA  $F= 9, 854$ ;  $p< 0, 001$ ). Os pontos P2 e P3 foram significativamente inferiores do controle, segundo o teste de Dunnett. Quanto ao percentual médio de copepoditos houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 60,03$ ;  $p< 0, 001$ ), todos os pontos foram inferiores ao controle. Já o percentual de mortalidade houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 7, 984$ ;  $p= 0, 002$ ), São diferentes e inferiores ao controle P3, P4, P5 e P6 (Figura 6).



**Figura 6:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortalidade de juvenis de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE em outubro de 2009. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.

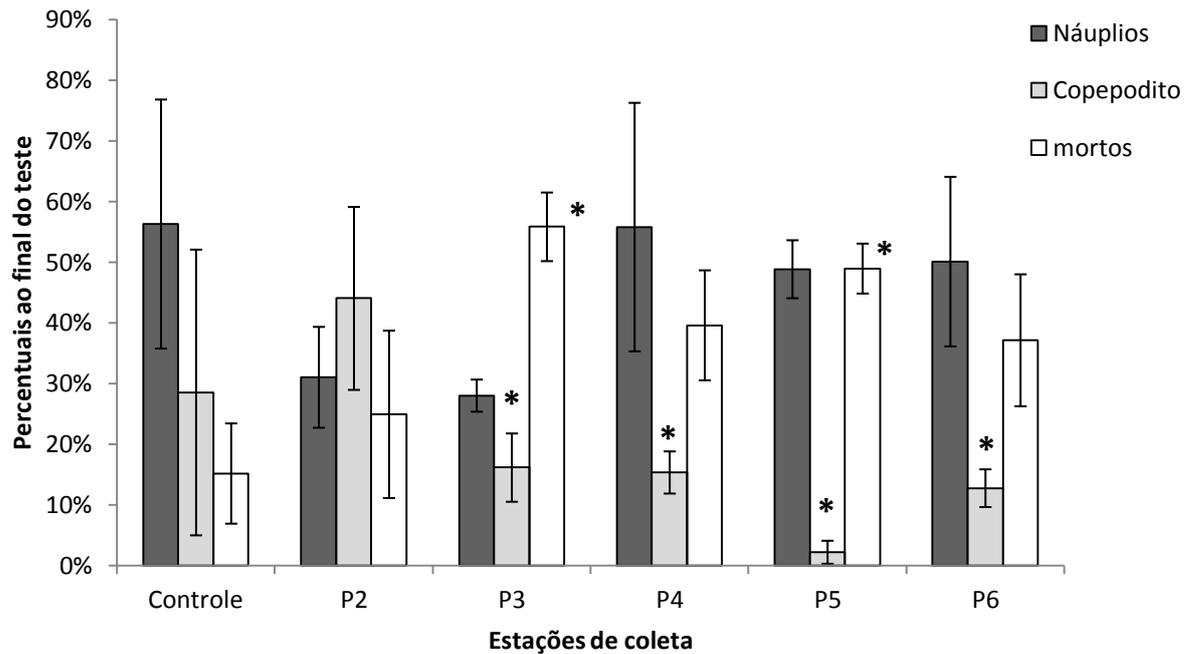
### 1.3.3 Dezembro 2009

Em dezembro de 2009, o percentual de pluteus bem formados foi de 81,8% no controle. Nesta campanha apenas as amostras P2, P5 e P6 diferiram significativamente do controle (ANOVA  $F= 25,55$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 7).



**Figura 7:** Percentual médio de pluteus de *Lytechinus variegatus* bem formados ao término do teste com as amostras coletadas no Sistema Estuarino de Suape – PE em dezembro de 2009. Os asteriscos indicam as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.

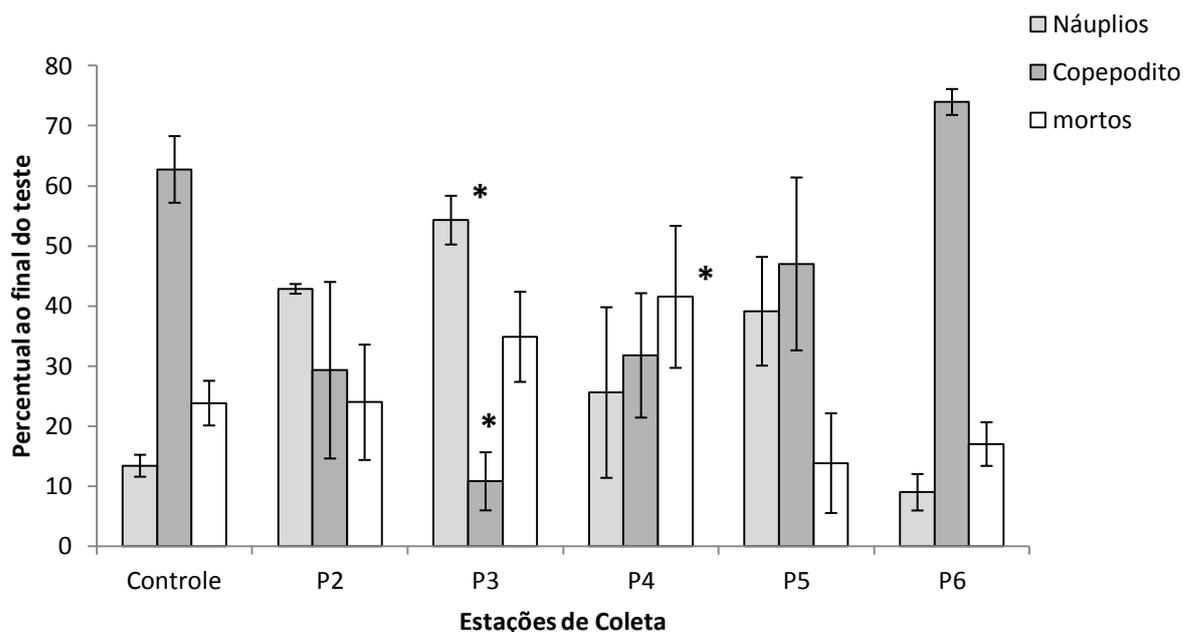
O percentual médio de náuplios para o mesmo período observou-se que não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 2, 438$ ;  $p= 0, 096$ ). No entanto, para o percentual de copepoditos houve diferença significativa (ANOVA  $F= 11, 613$ ;  $p= 0, 0004$ ), de acordo com o teste de Dunnett apenas o P2 não diferiu significativamente do controle. Quanto à mortalidade, houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 6, 406$ ;  $p= 0, 005$ ), sendo P3 e P5 diferentes (Figura 8).



**Figura 8:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortalidade de juvenis de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE em dezembro de 2009. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.

### 1.3.4 Fevereiro 2010

Devido ao percentual de desenvolvimento insatisfatório dos embriões de *L. variegatus*, o teste realizado em fevereiro de 2010 não foi considerado válido. O percentual de náuplios observados no controle variou significativamente (ANOVA  $F= 9, 184$ ;  $p < 0, 001$ ), sendo P3 diferente do controle de acordo com o teste de Dunnett. No entanto, observando o gráfico fica perceptível que P2 e P5 têm uma forte tendência de aumento em relação ao controle. Quanto ao percentual de copepoditos, os resultados observados mostraram que houve diferenças significativas (ANOVA  $F= 11,48$ ;  $p < 0, 001$ ), sendo esta diferença apenas em P3, que apresentou o menor desenvolvimento para fase de copepodito. No que se refere à mortalidade, constatou-se que há diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 4, 58$ ;  $p= 0, 017$ ), sendo o ponto P4 diferente do controle (Figura 9).



**Figura 9:** Percentual médio de náuplios, copepoditos e mortalidade de juvenis de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com as amostras ambientais do Sistema Estuarino de Suape – PE em fevereiro de 2010. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada pelo teste a posteriori de Dunnett.

## 1.4. DISCUSSÃO

Os experimentos realizados com náuplios de *T. biminiensis* comprovam que, a fase naupliar é sensível aos poluentes presentes na água superficial do Complexo Estuarino de Suape. Isso considerando a semelhança no padrão dos resultados observados com *L. variegatus*.

Os dados de abril sugerem que para os parâmetros subletais apenas em um ponto os resultados divergiram entre os juvenis de *T. biminiensis* e *L. variegatus*. Com base no observado para esta campanha, os embriões de ouriço foram um pouco mais sensíveis.

Já para os dados de outubro, o percentual de náuplios foi diferente em relação ao controle nas amostras P2 e P3. Já para o percentual de copepoditos, todas as amostras foram significativamente diferentes do controle. As amostras P3, P4, P5 e P6 não

apresentaram desenvolvimento da fase juvenil, logo foram consideradas tóxicas. No teste com *L. variegatus* apenas as amostras P3 e P6 foram consideradas tóxicas, nesta campanha os náuplios foram mais sensíveis que os embriões de ouriço.

Em dezembro do mesmo ano, no que se refere aos parâmetros subletais, o percentual médio de copepoditos apenas o ponto P2 foi semelhante ao controle. Já para o percentual de pluteus de *L. variegatus* formados P2, P5 e P6 foram considerados tóxicos, nos demais pontos os embriões não tiveram seu desenvolvimento prejudicado. Novamente nesta campanha os náuplios foram mais sensíveis que os embriões de ouriço.

Para janeiro de 2010, os dados subletais sugerem que apenas P3 apresenta toxicidade para os náuplios de *T. biminiensis*. Nesta campanha não foi possível uma comparação com o teste com os pluteus de *L. variegatus*, pois como não houve desenvolvimento satisfatório no controle em 28h, o teste foi descartado.

De acordo com Ihara *et al.*, (2010), nos últimos anos vem se observando no uma redução drástica nas populações de *Lytechinus variegatus*, espécie esta padronizada pela ABNT para ensaios de toxicidade crônica. Essa redução na população ocorre principalmente ao longo da costa Nordeste do Brasil, o que vem restringindo a sua utilização em ensaios ecotoxicológicos. O mesmo ocorre nas regiões de clima temperado, a abundância de *L. variegatus* diminui consideravelmente nos meses de inverno, em decorrência da redução da temperatura da água (Lotufo, 2008).

Os testes com copépodos foram padronizados pela ISO (14669-99), esta descreve métodos de determinação da toxicidade aguda da água do mar. A norma recomenda testes com copepoditos no estágio 5 ou adultos de *Acartia tonsa*, *Tisbe battagliai* copepoditos no estágio 1 o que corresponde a aproximadamente 2 dias de

vida e com *Nitocra spinipes* utilizando adultos com 3 ou 4 semanas de idade. A ASTM (E2317- 04) padronizou os testes de toxicidade de água do mar usando náuplios de *Amphiascus tenuiremis* com 24h de idade em placas de 96 poços e com duração de 48horas. Todos os testes realizados foram fundamentados no protocolo proposto pela ASTM e na ISO.

Num estudo realizado por Forget *et al.*, (1998) sobre a mortalidade da CL50 para os diferentes estágios do ciclo de vida do copépodo *Tigriopus brevicornis*, constatou-se que os náuplios foram de 2 a 4 vezes mais sensíveis que os estágios de juvenil e adulto. Segundo Bechman (1999), a metamorfose que ocorre na passagem do estagio naupliar para o estágio de copepodito é o evento mais importante no ciclo de vida dos copépodos.

Nos copépodos, o desenvolvimento larval do estágio de náuplios para copepodito incluem 11 mudas de ecdise e 1 metamorfose, esta caracteriza o estágio juvenil. Tanto as mudas quanto a metamorfose são reguladas por hormônios (Andersen *et al.*, 2001; Forget-Leray *et al.*, 2005; Dahl *et al.*, 2006). Para Lee *et al.* (2008), os teste com náuplios são muito úteis, pois o não desenvolvimento dos indivíduos em questão pode estar diretamente relacionado com a inibição dos hormônios responsáveis pela troca das ecdises e pela metamorfose do copépodo.

De acordo com estudo realizado por Huang *et al.*, (2006), os náuplios do copeópodo *Pseudodiaptomus marianus* demonstraram maior sensibilidade do que os copepoditos quando expostos a baixas concentrações de TBTO (Óxido de Tributilestanho). A taxa de desenvolvimento larval é uma indicação de como o poluente age nas fases juvenis, podendo ser um desregulador endócrino, e que provavelmente aparecerá em concentrações muito baixas se compararmos com as

concentrações letais (Breitholtz & Bengtsson, 2001; Breitholtz *et al.*, 2003; Forget- Leray *et al.*, 2005).

Segundo Templeton *et al.* (2006) num estudo de ciclo de vida com o copépodo *Amphiascus tenuiremis* mostraram que na mais alta concentração do composto testado o número copepoditos foi inferior, bem como, o número de adultos. O tratamento com a concentração mais elevada, ainda teve um atrasado de desenvolvimento de 6 dias em relação ao controle. Diz *et al.* (2009) comprovaram que os testes com náuplios de *Tisbe battagliai* foram mais sensíveis ao cobre e ao LAS (Alquibenzeno Linear) que os testes realizados com copépodos na fase adulta.

## **1.5. CONCLUSÃO**

Os dados apresentados mostram que os náuplios do copépodo harpactíóide *Tisbe biminiensis* podem ser utilizados em testes de toxicidade de água do mar com sucesso. Pois, apresentaram um padrão bem semelhante de toxicidade observa no teste com embriões do ouriço *Lytechinus variegatus*. Ainda de acordo com os resultados obtidos o desenvolvimento da fase naupliar apresentou em alguns momentos sensibilidade maior que o teste feito com embriões de ouriço. E diante da escassez de indivíduos de *L. variegatus* em nossa região, o teste com náuplios de copépodos pode e deve ser utilizado como uma alternativa na avaliação da toxicidade da água.

## **CAPÍTULO II**

**COMPARAÇÃO DAS SENSIBILIDADES DOS COPÉPODOS *TISBE*  
*BIMINIENSIS* E *NITOKRA* SP. EM TESTES COM SEDIMENTOS  
ESTUARINOS**

## RESUMO

Os testes de toxicidade são utilizados como uma ferramenta de monitoramento ambiental. Os bioensaios de toxicidade de sedimento com copépodos são usados mundialmente e no Brasil a espécie marinha de copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* vem sendo usada desde 2003. O objetivo deste estudo foi comparar a resposta de *T. biminiensis* àquelas do copépodo estuarino *Nitokra* sp. e do anfípodo *Tiburonella viscana*, também usados na avaliação de sedimentos. As amostras de sedimento foram coletadas no Sistema estuarino de Santos e São Vicente – SP são elas: Alemoa, Cosipa/Usiminas, Marina e Mariana; Complexo Estuarino de Suape P1, P2, P3, P4, P5 e P6; Parque dos Manguezais, Pina. Os sedimentos usados como controles foram coletados na praia do Engenho D'água em Ilhabela-SP e no Estuário do rio Maracápe, Ipojuca-PE. Para os testes com *T. biminiensis* e *Nitokra* sp cada recipiente recebeu aproximadamente 2g de sedimento peneirado e 20 mL de suspensão de diatomácea na concentração de 0,2µg Chl-a/mL para o *Tisbe* e apenas 20m L de água do mar para *Nitokra*. No dia seguinte, dez fêmeas ovíferas foram adicionadas e mantidas em incubadora a 25°C, 12/12h durante 7 e 10 dias respectivamente. Ao término da duração dos testes, as amostras foram coradas com rosa de bengala e fixadas com formol a 4%. Já para o teste com anfípodo foram feitas 3 réplicas de sedimento integral para cada amostra contendo 200mL e adicionado 600mL de água do mar, 24h depois foram adicionados 10 adultos de *T. viscana* por recipiente. A duração do teste foi de 10 dias e ao término a sobrevivência foi observada. Os dados obtidos nos três experimentos foram submetidos a ANOVA. , *Nitokra* sp, foi mais sensível como “endpoints” subletais. Quando expostos aos sedimentos de Suape e do Pina os copépodos mostraram o mesmo padrão de resposta ecotoxicológica, no entanto, *Nitokra* demonstra maior sensibilidade. Logo, ambos os organismos podem ser utilizados, recomenda-se a utilização dos dois testes em paralelo quando possível, a fim de obter uma resposta ecotoxicológica da amostra ambiental mais conclusiva, bem como realizar testes com organismos de outros níveis tróficos.

**Palavras chave:** Sedimento , *Tisbe biminiensis*, *Nitokra* sp

## 2.1 INTRODUÇÃO

Alguns dos lugares com maior densidade populacional e industrialização no Brasil estão localizados na zona costeira, próximos a baías e estuários, contribuindo para a poluição destes ambientes (Melo & Nipper, 2007). A qualidade dos ambientes marinhos nos últimos anos vem ganhando destaque mundialmente, hoje existe um enorme interesse na preservação desses ambientes e na recuperação daqueles que já foram impactados (Adams *et al.*, 1992; DeWitt *et al.*, 1989)

Os sedimentos são um compartimento importante na deposição de contaminantes e substrato para diversos organismos, uma resolução do CONAMA (2004) recomenda a realização de testes de toxicidade para avaliação dos sedimentos dragados, bem como, a caracterização química dos mesmos, cujo objetivo é avaliar os impactos a biota e o local de disposição dos mesmos (Araújo-Castro, 2008). Segundo Abessa *et al.*, (2006) grande parte dos contaminantes, lançados no mar depositam-se nos sedimentos, produzem efeitos tóxicos sobre a fauna e acabam afetando o equilíbrio ambiental.

Os testes de toxicidade são ferramentas efetivas na avaliação da qualidade dos sedimentos, estes consistem na exposição de um organismo pré-selecionado a uma substância biologicamente ativa (no caso de sedimentos, amostras coletadas em campo, fases líquidas obtidas a partir desta, ou ainda, sedimento limpo contaminado por um ou mais poluentes), e determinação de efeitos letais e subletais (Chapman & Long, 1983; Lamberson *et al.*, 1992).

Os anfípodos, bem como os copépodos são organismos importantes na cadeia alimentar aquática, servindo de alimento para crustáceos maiores e aves. Atualmente as espécies de crustáceos usadas em testes de avaliação de toxicidade em sedimentos

marinhos e estuarinos no Brasil incluem os copépodos *Tisbe biminiensis* (Araújo-Castro *et al.*, 2009) e *Nitokra* sp (Lotufo & Abessa, 2002), o anfípodo *Tiburonella viscana* (Abessa *et al.*, 1998; Melo, 1993; Melo & Abessa, 2002), o tanaidáceo *Kalliapseudis schubartii* (Zamboni, 2000; Zamboni & Costa, 2002) e pós-larva dos camarões *Litopenaeus* sp. (Nascimento & Evangelista, 2002) e *Penaeus paulensis* e *P. schmitti* (Moraes *et al.*, 1996).

O copépodo bentônico *T. biminiensis* é utilizado com sucesso em testes de toxicidade desde 2003. Estes foram usados por Araújo-Castro (2008) para avaliação da toxicidade dos sedimentos do Complexo Estuarino de Suape – PE e Baía de Todos os Santos – BA e por Oliveira (2008), avaliando a toxicidade dos sedimentos do Parque dos Manguezais. Já uma espécie nova do gênero *Nitokra* foi avaliada pelo grupo de pesquisa de ecotoxicologia do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (Lotufo & Abessa, 2002) e vem sendo usada na avaliação da toxicidade de sedimentos estuarinos, não só por esse grupo, mas também por pesquisadores de outros centros de pesquisa de São Paulo (UNESP) e de outros estados (CEM-UFPR, FURG-RS, e LABOMAR-UFC, entre outros).

O objetivo deste capítulo foi comparar a sensibilidade dos organismos teste *Tisbe biminiensis*, *Nitokra* sp e *Tiburonella viscana* a sedimentos com toxicidade anteriormente observada, através dos “endpoints” letalidade (sobrevivência) e subletalidade (fecundidade e taxa de eclosão).

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Áreas de Estudo

Três áreas em manguezais com toxicidade observada em estudos pretéritos foram escolhidas para a realização dos testes comparativos entre os copépodos *Tisbe biminiensis*, *Nitokra* sp. O bioensaio com o anfípodo *Tiburonella viscana* foi realizado para complementar os resultados. As coletas foram realizadas entre os meses de abril de 2010 a setembro de 2010.

#### 2.2.1.1 Sistema Estuarino de Santos e São Vicente – SP

O Sistema Estuarino de Santos e São Vicente na baixada santista em São Paulo, foi escolhido devido a contaminação histórica de seus sedimentos e por possuírem o maior Complexo Portuário da América do Sul. Os quatro pontos de amostragem determinados foram Alemoa (S 23° 54 753' - W 46° 21 506'), Cosipa/Usiminas (S 23° 52 817' – W 46° 22 611'), Marina (S 23° 58 946' - W 46° 23 819') e Mariana (S 23° 56 951' – W 46° 25 778') (Figura 10).

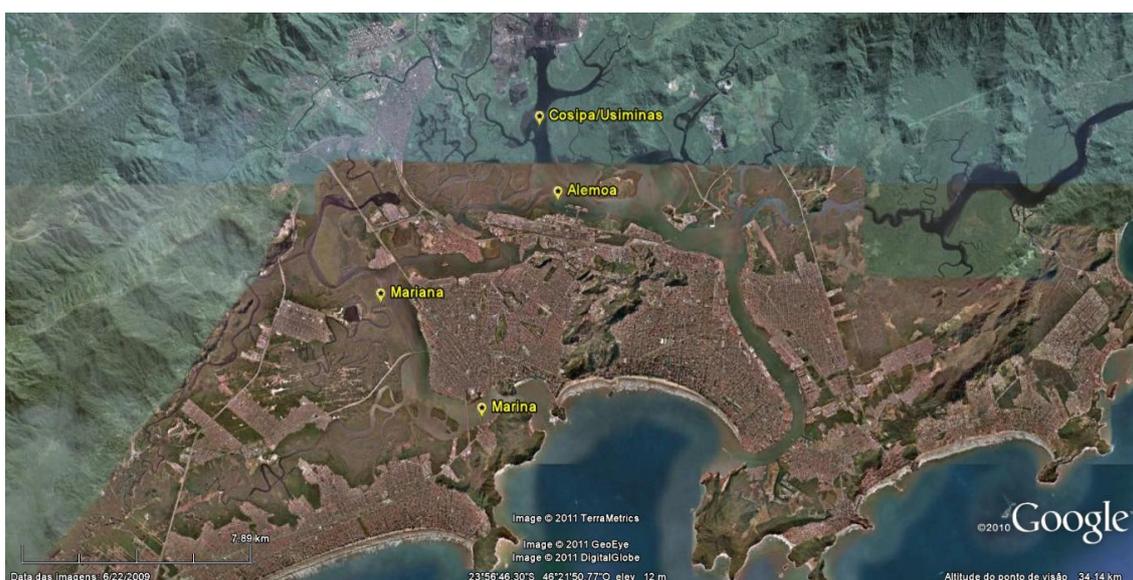
A Alemoa é considerado o bairro mais antigo de Santos, este surgiu sobre um extenso manguezal e atualmente abriga um complexo industrial, com pátios e depósitos de contêineres utilizados no transporte de cargas para o Porto de Santos. É na Alemoa que está localizado um dos lixões mais antigos do Estado de São Paulo era neste local que durante muitos anos os resíduos tóxicos do Porto de Santos foram descartados. O ponto onde o sedimento foi coletado fica próximo a uma torre de observação.

Já o ponto Cosipa/Usiminas está localizado próximo a Companhia Siderúrgica Paulista ou ainda Usina José Bonifácio de Andrade e Silva, localiza-se no município

Paulista de Cubatão no litoral do Estado de São Paulo e após a privatização passou a ser controlada pela Usiminas. A siderúrgica está instalada numa área de mangue denso próximo ao terminal da Alemoa. Próximos ao ponto de coleta estão 23 empresas químicas com alto potencial poluidor, o que compromete muito a qualidade ambiental. E devido à presença histórica de vários contaminantes neste local optamos pela utilização destas amostras para os testes de comparação.

O ponto de amostragem Mariana está localizado no rio que dá nome ao local de coleta, e foi escolhido por receber contribuição de poluentes oriundos de áreas contaminadas por organoclorados e metais pesados, é receptor de esgoto *in natura* e chorume do lixo de Sambaiatuba (Lamparelli *et al.*, 2001).

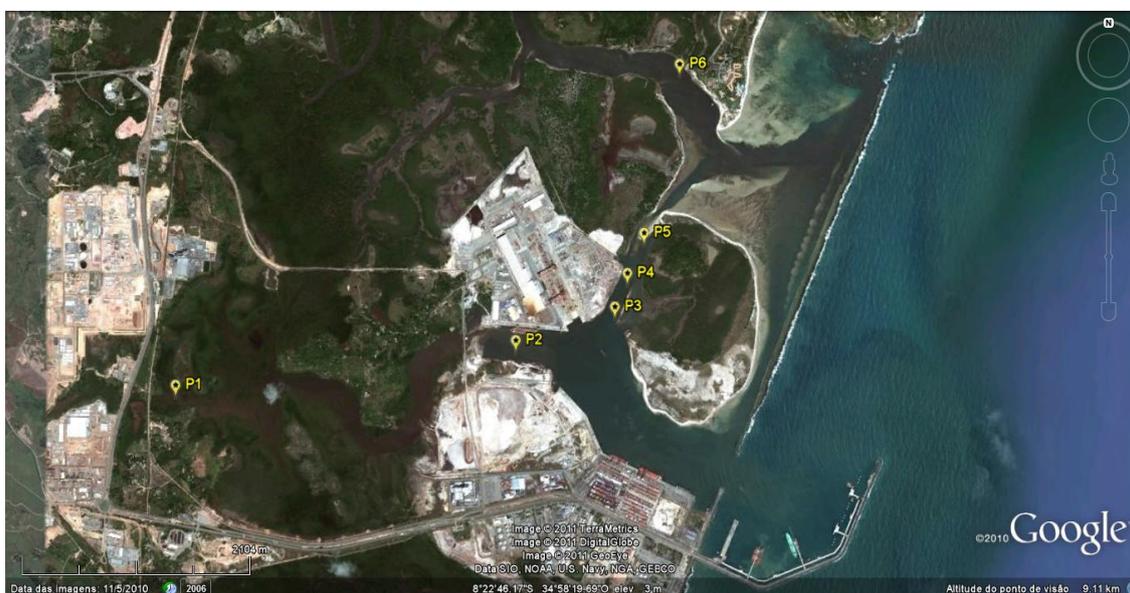
Por fim, o ponto Marina situado em frente a algumas marinas de São Vicente e próximo a um bairro residencial, este foi local escolhido devido ao fluxo intenso de embarcações no local e descarga antropogênica e por haver histórico de contaminação por detergentes e PCB's. (Abessa *et al.*, 2001).



**Figura 10:** Localização dos locais de coleta de sedimento no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente – SP.

### 2.2.1.2 Sistema Estuarino de Suape

As seis amostras de sedimentos coletadas no Complexo Estuarino de Suape foram nomeadas e georeferenciadas são elas: P1(S 8° 23' 00" – W 46° 59' 07") P2 (S 8° 22' 55" – W 46° 58' 38"), P3 (S 8° 22' 50" – W 46° 57' 59"), P4 (S 8° 22' 30" – W 46° 57' 59"), P5 (S 8° 22' 22" – W 46° 57' 51") e P6 (S 8° 21' 36" – W 46° 57' 45"). Abaixo uma figura que mostra a localização no mapa dos locais de coleta (Figura 11). A área de coleta de sedimento é a mesma onde foram realizadas as coletas das amostras ambientais de água no capítulo 1.

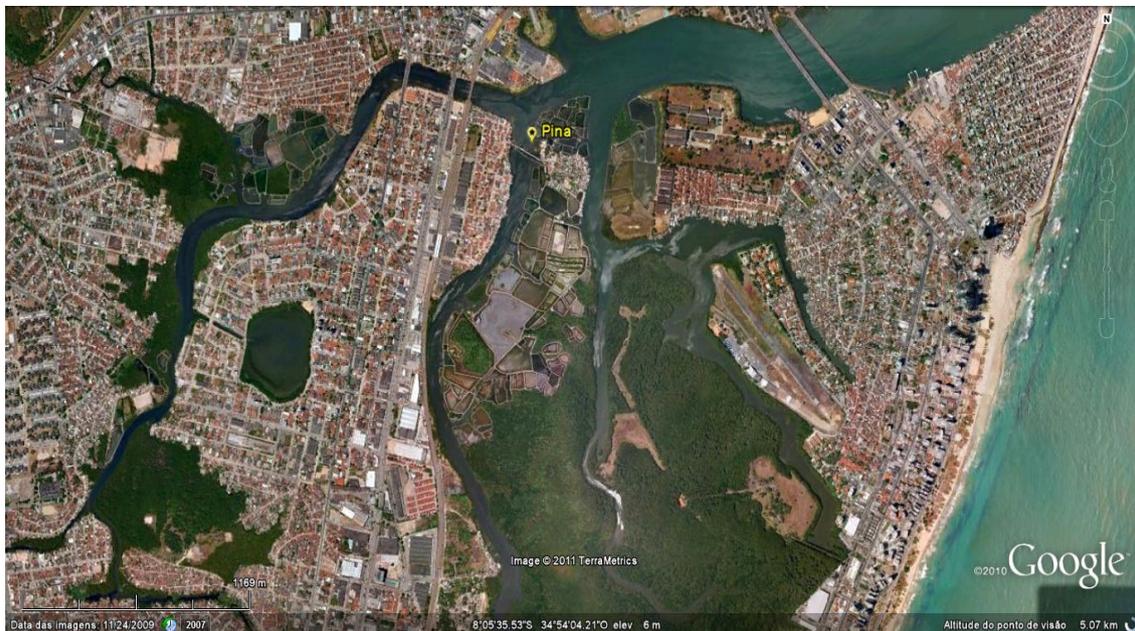


**Figura 11:** Localização dos pontos de amostragem de sedimento no Sistema Estuarino de Suape – PE.

### 2.2.1.3 Bacia do Pina

Por fim a amostra de sedimento coletada nas proximidades da Ilha de Deus, num banco de lama exposto durante a maré baixa, a amostra foi denominada de Pina Este local de coleta foi escolhido com base nos dados obtidos por Oliveira (2008) e Silva *et al.* (2011) para a região conhecida como Parque dos Manguezais (Figura 12). O local em questão está situado numa área urbana densamente povoada, que tem muitos

viveiros de camarão, sofre com o desmatamento do mangue e recebe esgoto *in natura* de muitas residências próximas.



**Figura 12:** Localização do ponto de amostragem de sedimento no Parque dos Manguezais.

### 2.2.2 Coleta das amostras de sedimento

O método de amostragem de sedimento foi semelhante em cada uma das 3 diferentes localidades,. As amostras foram coletadas com auxílio de uma draga do tipo van Veen, sendo esta lançada 3 vezes por ponto de coleta. Cada amostra de sedimento coletado foi homogeneizada e armazenada em sacos plásticos e ou recipientes de vidro descontaminados.

### 2.2.3 Coleta do sedimento controle

O sedimento utilizado como controle em todos os testes de toxicidade realizados com os sedimentos de Santos e São Vicente foi coletado na praia do Engenho D'água em Ilhabela, litoral norte do estado de São Paulo. Já o sedimento utilizado como

controle em todos os testes de toxicidade com os sedimentos coletados em Suape e no Pina foi coletado no estuário do rio Maracaípe – PE, que fica no litoral sul do estado de Pernambuco (Figura 13).



**Figura 13:** Localização do ponto de amostragem do sedimento controle no manguezal da praia de Maracaípe, Ipojuca – PE.

## 2.2.4 Testes de toxicidade com *Tiburonella viscana*

### 2.2.4.1 Coleta e aclimação dos organismos

Os anfípodos da espécie *Tiburonella viscana* foram coletados na porção inferior da zona entre-marés da praia do Engenho D'água, localizada em Ilhabela, na região central do Canal de São Sebastião, SP, com auxílio de uma draga de arrasto conectada a uma malha de 0,5mm de abertura (Melo & Nipper, 2007). Foram realizados alguns arrastos e em seguida o peneiramento do material coletado. Os anfípodos encontrados

na superfície da água remanescente da draga são retirados com auxílio de uma peneira com abertura de malha de 1,0mm e acondicionados em potes de polietileno de 1L contendo água do mar e sedimento do local (Melo & Abessa, 2002).

Após a identificação, os organismos foram transferidos para uma bacia plástica contendo sedimento do local de coleta peneirado e água do mar com salinidade  $34 \pm 1$  e temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Os indivíduos foram mantidos com temperatura controlada em  $25 \pm 2$  C° e iluminação constante como são sugeridos pela ASTM (1993) na tentativa de reduzir a atividade dos organismos na superfície. A aeração foi introduzida no sistema e o período de aclimação dos organismos durou 3 dias (Melo & Abessa, 2002).

#### **2.2.4.2 Bioensaio**

Um dia antes do início do teste, os sedimentos coletados foram homogeneizados e três sub-amostras de aproximadamente 200 mL de sedimento integral de cada ponto foram distribuídas em recipientes plásticos de aproximadamente 1L. Caso houvesse presença de possíveis predadores, seria feito o procedimento padrão recomendado pela ASTM (1993), que consiste no peneiramento da amostra por malha de 2 mm e sendo o predador visível retirada do indivíduo com pinça.

Após a distribuição dos sedimentos, cada recipiente recebeu 600 mL de água do mar filtrada para recobrir o sedimento, esta foi introduzida com auxílio de Placa de Petri para reduzir a ressuspensão dos mesmos. O sistema de aeração foi colocado, para assegurar as concentrações ideais de oxigênio dissolvido tanto na água como na superfície do sedimento.

No dia seguinte, 10 anfípodos foram colocados em cada recipiente com auxílio de uma pipeta Pasteur de boca larga. O teste teve duração de 10 dias. Os parâmetros físico químicos (OD, salinidade, pH e NH<sub>3</sub>) foram medidos no início e no término do teste. A metodologia acima descrita foi proposta por Melo & Abessa (2002).

### **2.2.5 Teste de toxicidade com *Tisbe biminiensis***

O teste com os sedimentos tóxicos coletados no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, Sistema Estuarino de Suape e Pina utilizando fêmeas de *Tisbe biminiensis* seguiram a metodologia proposta por Araújo-Castro *et al.* (2009).

As amostras de sedimento foram passadas por uma peneira com malha de abertura de 64 µm e água do local de coleta, por fim refrigerado a 4°C, por cerca de 24 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento distribuído em recipientes de vidro descontaminados, contendo aproximadamente 2g de sedimento cada um. Para cada ponto, foram feitas quatro sub-amostras, a fim de avaliar a variabilidade entre os grupos de organismos testados. Cada um dos recipientes recebeu 20 mL de suspensão algal com concentração de 0,2 µg Chl-a/mL de diatomácea *Thalassiosira fluviatis* e posteriormente foi levado à estufa incubadora a 25°C e fotoperíodo de 12/12 horas claro/escuro durante 24 horas. Após este intervalo, 10 fêmeas ovígeras com idade controlada (12 dias aproximadamente) foram adicionadas em cada recipiente. A duração do teste de toxicidade foi de sete dias, a cada dois dias foi adicionado 1mL de diatomácea concentrada para alimentação dos indivíduos.

Os parâmetros físico-químicos pH, Oxigênio Dissolvido (O.D) e Salinidade foram observados no início, no quarto dia e ao término do experimento. Após a

medição dos parâmetros, o conteúdo presente em cada recipiente foi transferido para potes plásticos, corados com rosa de bengala e fixados com formol a 4% para posterior contagem dos indivíduos. A determinação do efeito letal, morte das fêmeas adultas foi realizada pela observação de fêmeas não coradas em rosa. Os efeitos subletais observados no presente estudo foram a fecundidade total (náuplios + copepoditos) e a taxa de eclosão, que é o número de indivíduos produzidos por fêmeas durante o teste.

### **2.2.6 Teste de toxicidade com *Nitokra* sp**

O teste toxicológico com *Nitokra* sp seguiu a metodologia proposta por Lotufo & Abessa (2002), este teve substituição do sedimento integral por sedimento peneirado foi modificado do procedimento adotado.

As amostras de sedimento foram distribuídas em recipientes de vidro contendo aproximadamente 2g de sedimento peneirado e 10 mL de água do mar filtrada com salinidade entre  $20 \pm 2$ . Para cada amostra, foram feitas três sub-amostras, a fim de avaliar a variabilidade entre os grupos de organismos testados. Posteriormente os recipientes foram levados a estufa incubadora a 25°C durante 24 horas. Após este intervalo, 10 fêmeas ovígeras de *Nitokra* sp foram adicionadas em cada recipiente. O fotoperíodo estabelecido pro teste foi de 24 horas de claro, para aumentar a exposição das fêmeas ao sedimento. A duração do teste de toxicidade foi de dez dias.

No décimo dia de teste os parâmetros físico-químicos foram medidos novamente. Após a medição dos parâmetros, o conteúdo presente em cada recipiente foi transferido para potes plásticos, corados com rosa de bengala e fixados com formol a 4% para posterior contagem dos indivíduos. A do efeito letal, morte das fêmeas adultas

foi realizada pela observação de fêmeas não coradas em rosa. Os efeitos subletais observados no presente estudo foram a fecundidade total (náuplios + copepoditos) e a taxa de eclosão, que é o número de indivíduos produzidos por fêmeas durante o teste.

### **2.2.7 Teste com substância de referência**

Cada uma das espécies utilizada nos testes de toxicidade teve sua sensibilidade testada através de testes com substância de referência, o Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). As concentrações utilizadas para o teste com anfípodo foram (50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 ppm). Já para os testes realizados com os copépodos as concentrações foram (50, 25, 10, 5 e 1 ppm).

### **2.2.9 Análise dos dados**

Para a avaliação dos efeitos letais obtidos no teste com o anfípodo *Tiburonella viscana* os resultados para a sobrevivência foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para testar a normalidade. Após testar a normalidade, os resultados foram comparados através da Análise de Variância (ANOVA), havendo diferenças significativas em relação ao controle o teste de Dunnett foi aplicado a fim de localizar onde ocorrem tais diferenças.

O tratamento estatísticos dos dados para os experimentos de sedimento realizados com os copépodos *T. biminiensis* e *Nitokra* sp o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a homocedasticidade dos dados. Sendo os dados

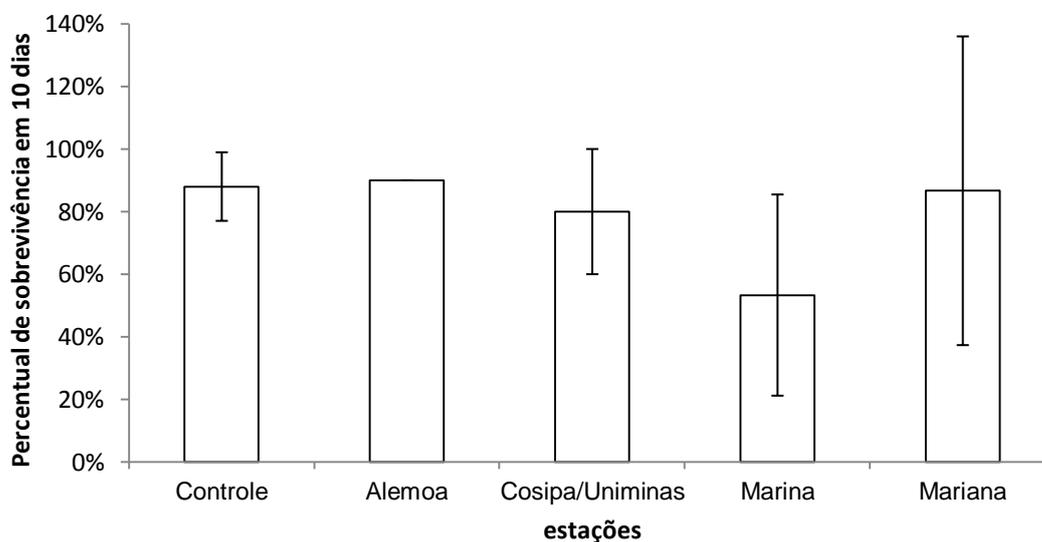
normais e homocedásticos, foi aplicada uma ANOVA com 95% de significância e o teste a posteriori de Dunnett a fim de, detectar onde ocorrem as diferenças significativas em relação ao controle.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Sistema Estuarino de Santos e São Vicente

#### 2.3.1.1 *Tiburonella viscana*

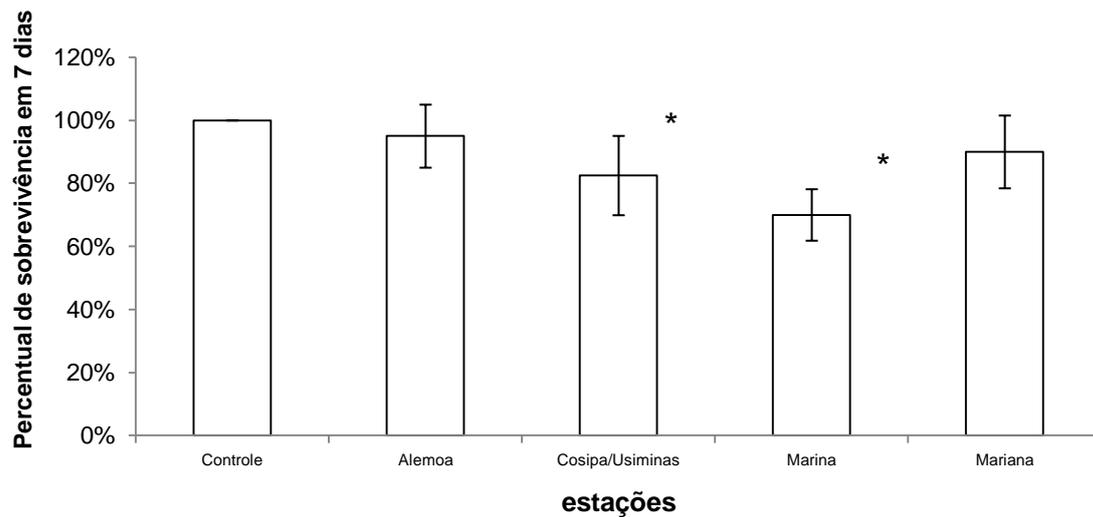
A análise do percentual de sobrevivência ao final dos 10 dias do teste com o anfípodo *T. viscana*, não indicou diferença significativa em relação ao controle (ANOVA,  $F= 1,052$ ;  $p= 0,421$ ) (Figura 14)



**Figura 14:** Percentual médio de *Tiburonella viscana* vivos ao término do experimento.

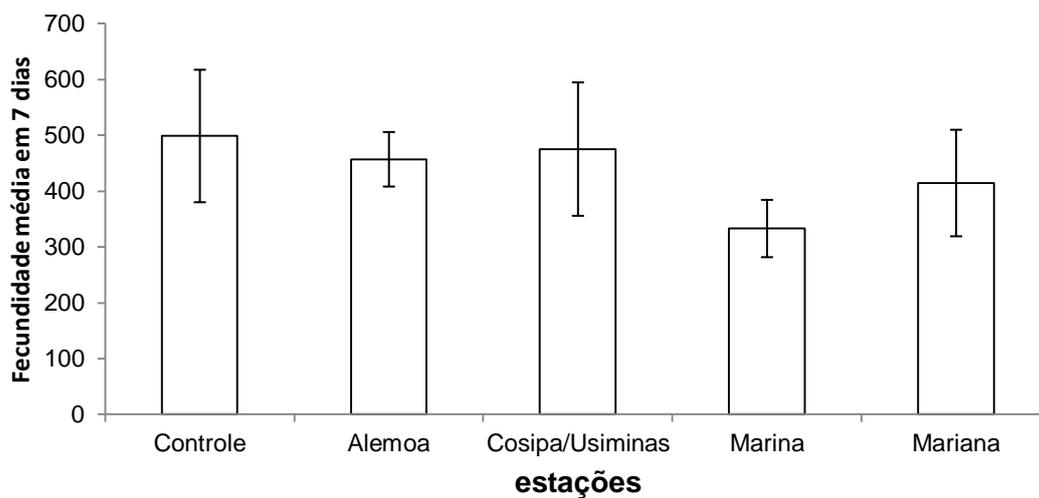
#### 2.3.1.2 *Tisbe biminiensis*

Já para os testes com o copépodo *Tisbe biminiensis*, quanto ao parâmetro sobrevivência houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA F=6; p= 0,004), sendo os pontos Cosipa/Usiminas e Marina diferentes (Figura 15).



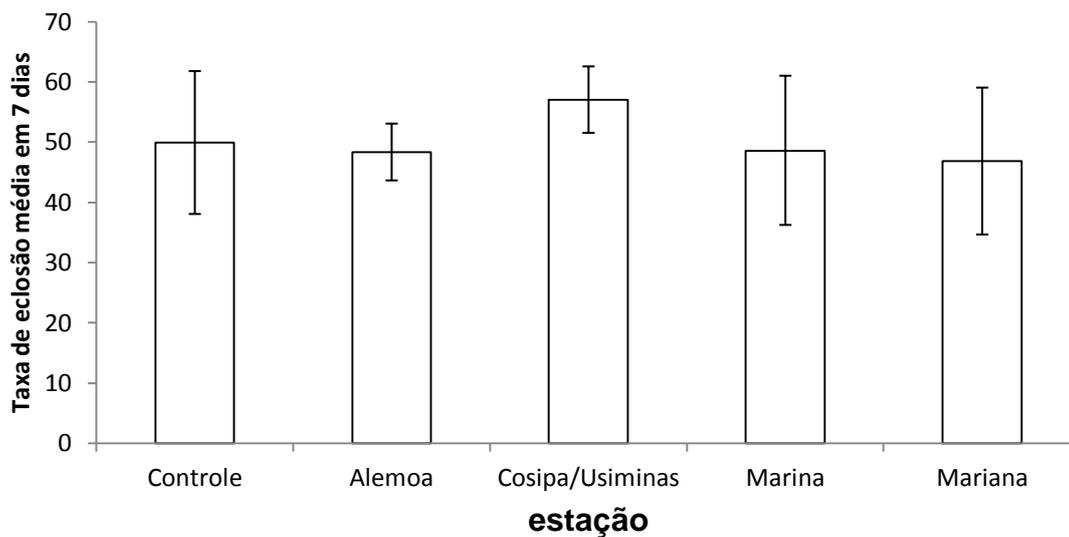
**Figura 15:** Percentual de fêmeas de *Tisbe biminiensis* vivas ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP. O asterisco representa a diferença encontrada pelo teste de Dunnett.

Para o parâmetro fecundidade (náuplios+copepoditos) de *T. biminiensis* não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA F=2; p= 0,146) (Figura 16).



**Figura 16:** Fedundidade Total (náuplios + copepoditos) de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP.

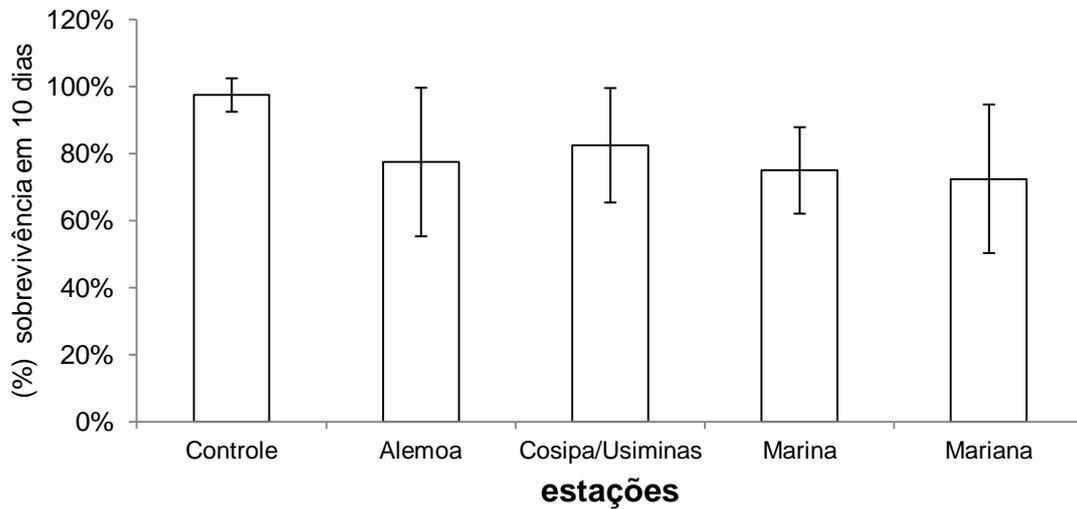
No que se refere à taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 0, 646$ ;  $p= 0,638$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** Taxa de Eclosão (Fecundidade/sobrevivência) de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP.

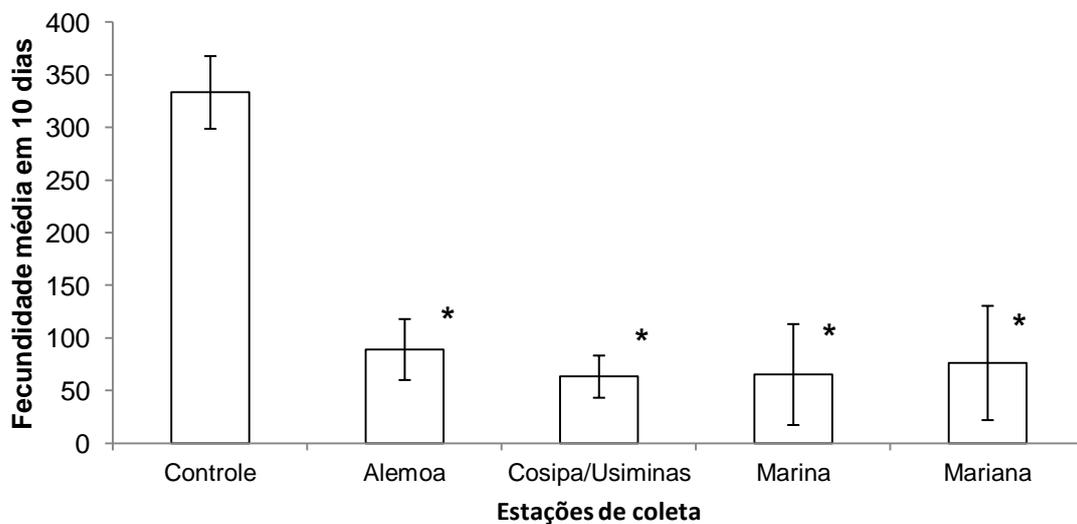
### 2.3.1.3 *Nitokra sp*

Nos testes realizados com *Nitokra sp* observou-se que não houve diferença significativa quanto a sobrevivência em relação ao controle (ANOVA  $F= 1,301$ ;  $p= 0,314$ ) (Figura 18).



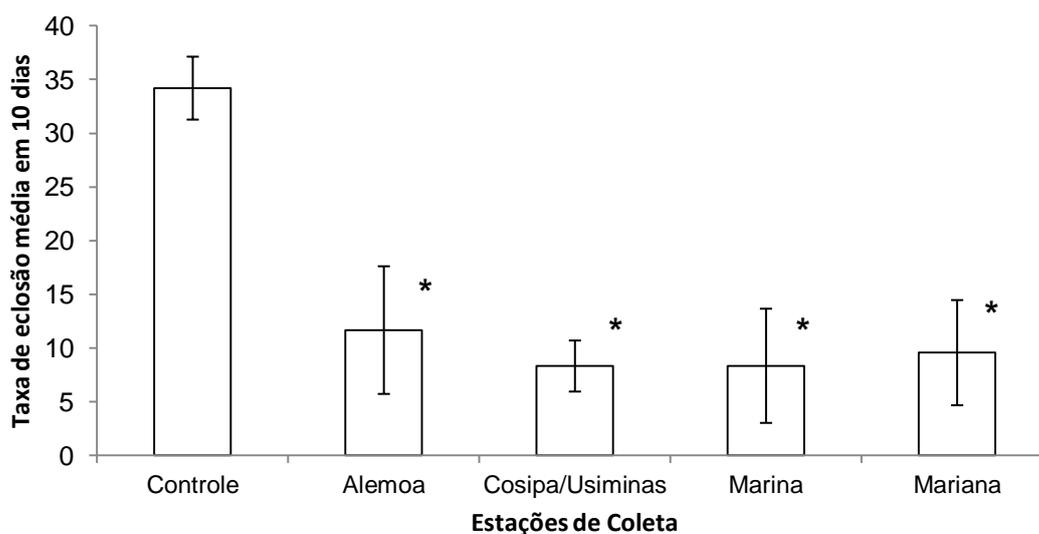
**Figura 18:** Percentual de sobrevivência de fêmeas de *Nitokra sp* vivas ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP.

Já a fecundidade (náuplios + copepoditos) foi significativamente diferente do controle (ANOVA  $F= 35,44$ ;  $p < 0,001$ ). Todas as amostras testadas foram diferentes do controle (Figura 19).



**Figura 19:** Fecundidade total (náuplios + copepoditos) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente - SP. Os asteriscos representam as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.

Para a taxa de eclosão, houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 24,39$ ;  $p < 0,001$ ) todos os pontos foram diferentes do controle, bem como na fecundidade (Figura 20).

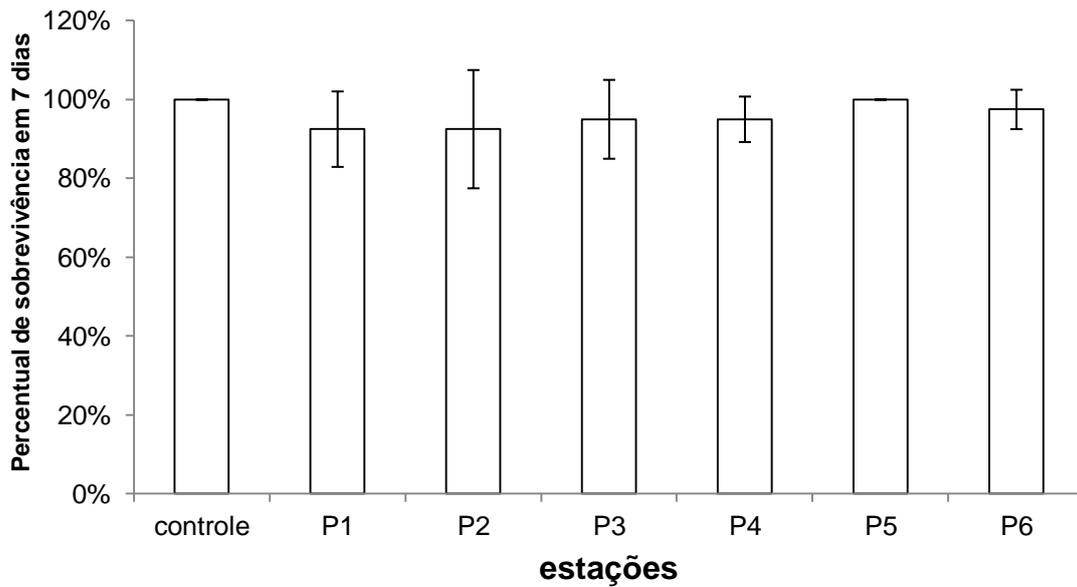


**Figura 20:** Taxa de eclosão (Fecundidade/sobrevivência) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente – S. Os asteriscos são as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.

### 2.3.2 Sistema Estuarino de Suape

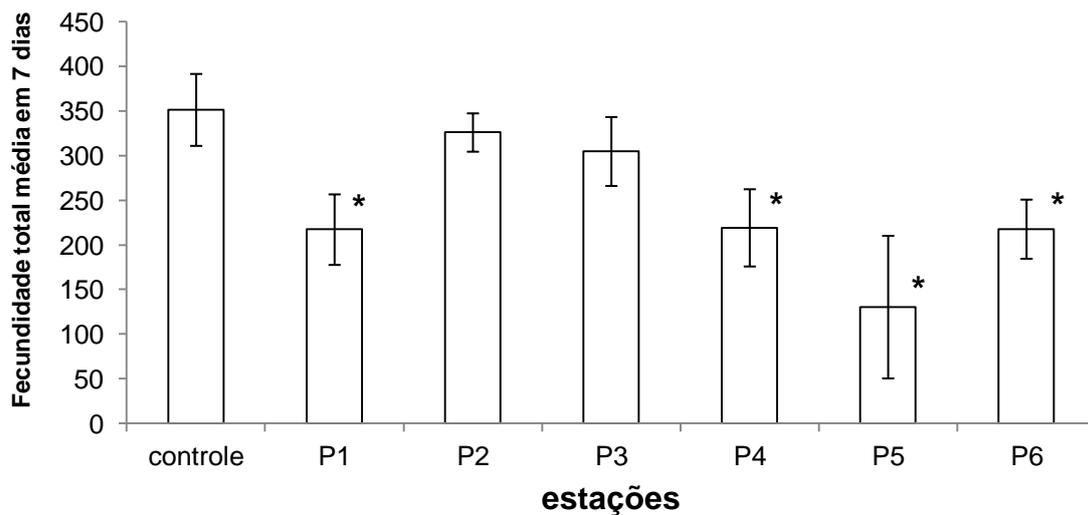
#### 2.3.2.1 *Tisbe biminiensis*

Os resultados de sobrevivência das fêmeas de *T. biminiensis* mostraram que não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 0,531$ ;  $p= 0,779$ ) (Figura 21X).



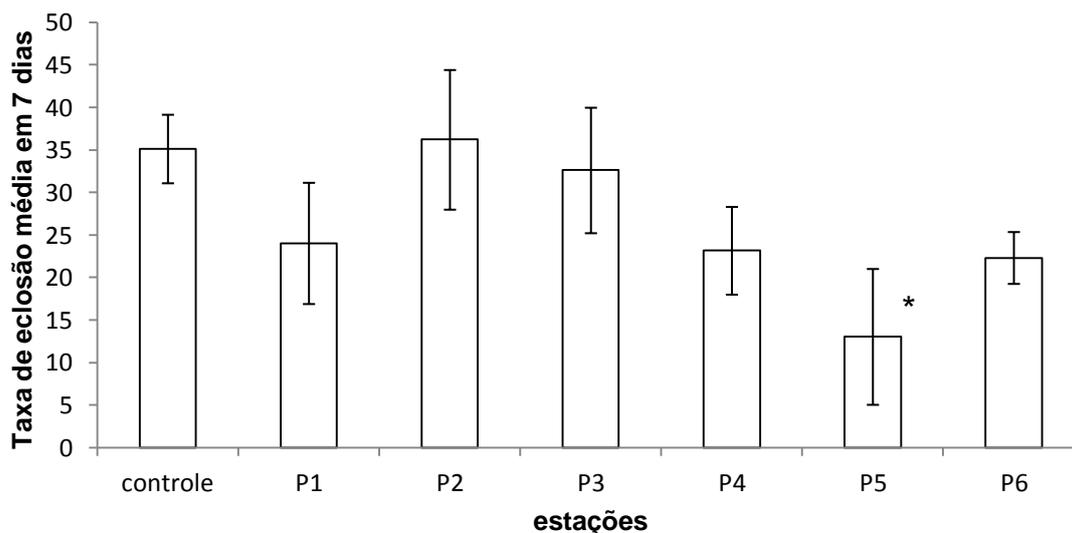
**Figura 21:** Percentual de sobrevivência de fêmeas de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape – PE.

No que se refere à fecundidade, houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 10,78$ ;  $p < 0,001$ ). O teste a posteriori de Dunnett mostrou que os pontos P1, P4, P5 e P6 são significativamente diferentes do controle (Figura 22).



**Figura 22:** Fecundidade total (náuplios+copepoditos) de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape. Os asteriscos representam as diferenças significativas encontradas pelo teste de Dunnett.

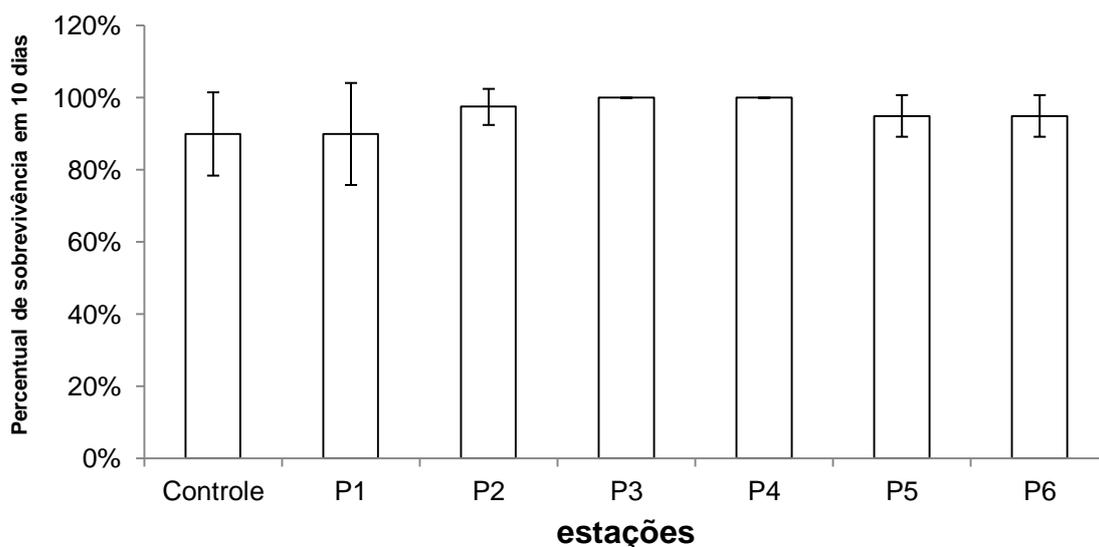
Para a taxa de eclosão, houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA  $F= 6, 328$ ;  $p= 0, 001$ ). O teste a posteriori de Dunnett mostrou que a única amostra diferente do controle foi a P5 (Figura 23).



**Figura 23:** Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) de *Tisbe biminiensis* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE. O asterisco representa a diferença encontrada pelo teste de Dunnett.

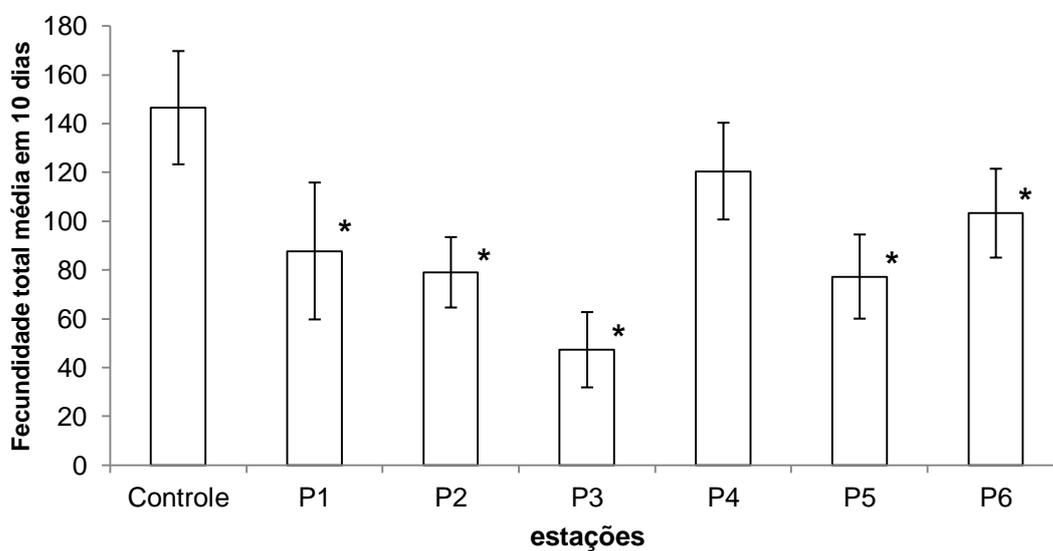
#### 2.3.2.2 *Nitokra sp*

No teste realizado em paralelo com o copépodo *Nitokra sp* observou-se que a sobrevivência foi significativamente diferente do controle (ANOVA  $F= 13,75$ ;  $p < 0,001$ ). Os pontos P3 e P4 foram superiores ao controle (Figura 24).



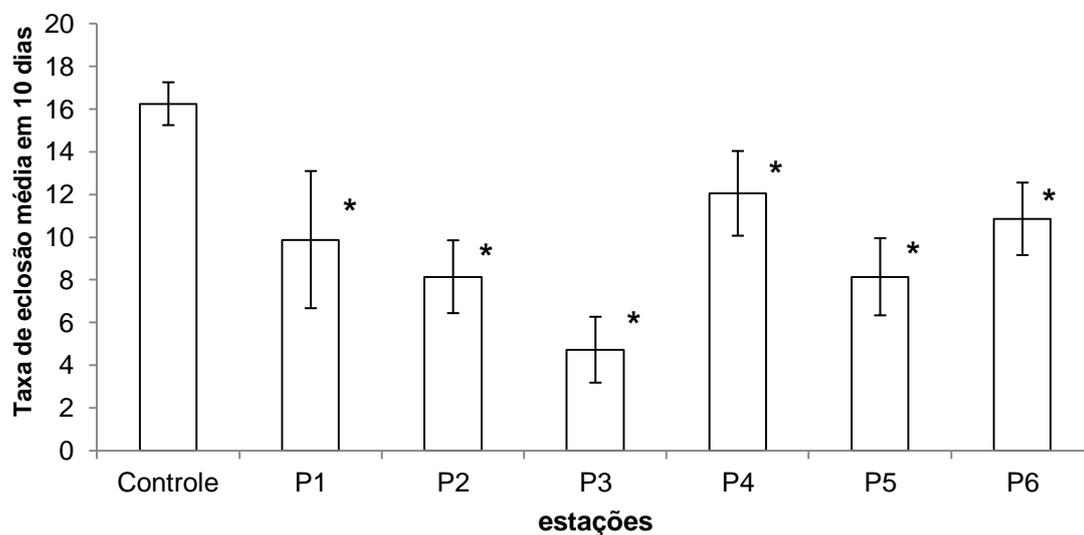
**Figura 24:** Percentual de sobrevivência das fêmeas de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE.

Quando analisada a fecundidade, foi detectada diferença significativa (ANOVA  $F= 10,46$ ;  $p < 0,001$ ), onde apenas a estação P4 foi semelhante quando comparada com o controle (Figura 25).



**Figura 25:** Fecundidade total (náuplios+copepodites) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE. Os asteriscos representam as diferenças encontradas pelo teste de Dunnett.

No que se refere à taxa de eclosão diferenças significativa foram encontradas (ANOVA  $F= 13,75$ ;  $p< 0,001$ ), todos os pontos amostrados apresentaram taxas inferiores a aquelas observadas no controle (Figura 26).

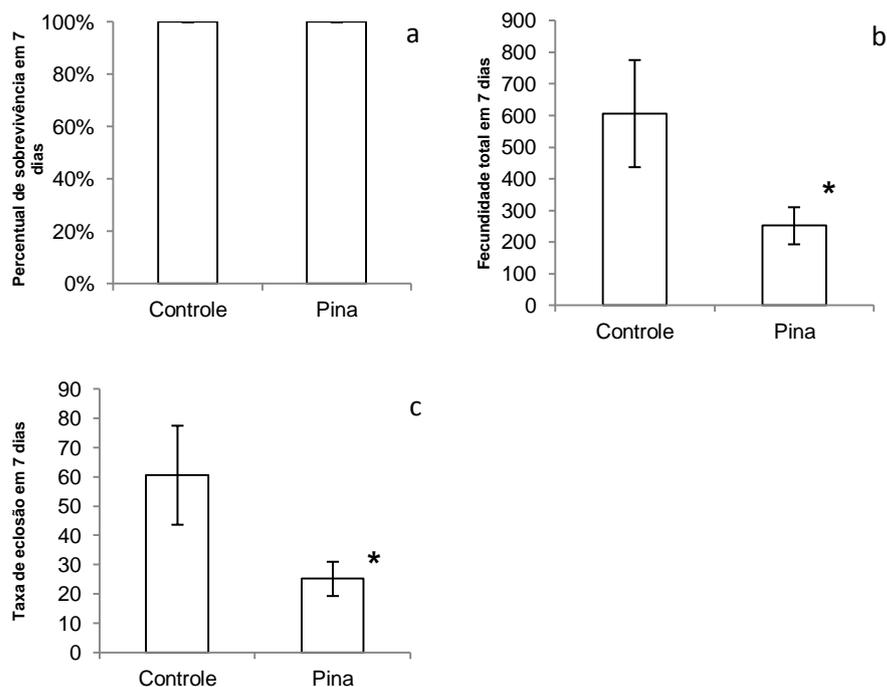


**Figura 26:** Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) de *Nitokra* sp ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape. Os asteriscos representam as diferenças encontradas pelo teste de Dunnett.

### 2.3.3 Pina

#### 2.3.3.1 *Tisbe biminiensis*

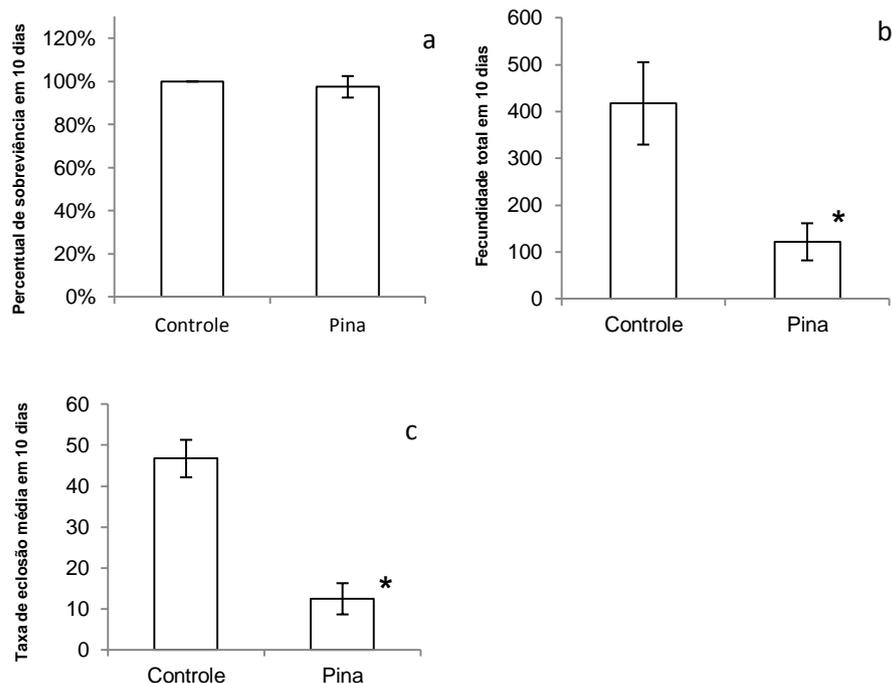
Nos testes realizados com *T. biminiensis* não houve variação na sobrevivência, ou seja, ao término do testes todas as fêmeas estavam vivas (Figura 27a). O parâmetros de fecundidade foi significativamente diferente do controle ( $t= 3,492$ ;  $p= 0,039$ ), já taxa de eclosão também foi diferente do controle ( $t= 3,492$ ;  $p= 0,039$ ) (Figura 27b e 27c respectivamente).



**Figura 27:** a – Percentual de fêmeas de vivas, b- Fecundidade total (náuplios + copepoditos) e c- Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) de *Tisbe biminiensis* ao término dos experimentos com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada no teste “t”

### 2.3.3.2 *Nitokra sp*

Os resultados do teste realizado com *Nitokra sp* mostram que para a sobrevivência não foi diferente do controle ( $t= 0,676$ ;  $p= 0,547$ ) (Figura 28a). No que se refere à fecundidade houve diferença significativa em relação ao controle ( $t= 5,615$ ;  $p= 0,011$ ) e para a taxa de eclosão, também observou-se diferença significativa ( $t= 36,459$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 28b, c respectivamente).



**Figura 28:** a – Percentual de fêmeas de vivas, b- Fecundidade total (náuplios + copepoditos) média e c- Taxa de eclosão (fecundidade/sobrevivência) média de *Nitokra sp* ao término do experimento com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape - PE. Os asteriscos representam a diferença significativa encontrada no teste “t”

## 2.4 DISCUSSÃO

Segundo Melo & Nipper, (2007) a resolução do CONAMA nº344 (2004) para sedimentos provenientes de dragagem, recomenda que estes sejam submetidos a testes de toxicidade. A mesma resolução ainda sugere que os critérios para avaliação dos resultados sejam baseados na DQS (Diretrizes de Qualidade de Sedimento) desenvolvida pelos Estados Unidos e Canadá. A avaliação química feita nos sedimentos também deve ser baseada nos SQGs. Como o sistema estuarino de Santos é um local que passa por dragagens periódicas, a realização do teste com anfípodos como meio de

comparação entre os testes com copépodos foi importante para uma melhor observação dos resultados obtidos.

De acordo com o trabalho de Torres *et al.*, (2009), foi constatado que os sedimentos dragados do porto de Santos não causam toxicidade ao anfípodo *Tiburonella viscana*. O que corrobora os dados obtidos no presente estudo.

O teste de toxicidade expondo, o copépodo *T. biminiensis* aos sedimentos coletados no Complexo estuarino de Santos e São Vicente mostrou que, os resultados obtidos não foram semelhantes àqueles observados com o anfípodo *T. viscana*. O parâmetro sobrevivência foi o único que se apresentou diferente significativamente em relação ao controle, o sedimento coletado nos pontos Cosipa/Usiminas e Marina localizados no estuário de Santos e São Vicente – SP, respectivamente, foram distintos estatisticamente. Os demais parâmetros estabelecidos (Fecundidade e taxa de eclosão) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Já na exposição do copépodo *Nitokra* sp, os parâmetros fecundidade e taxa de eclosão foram diferentes do controle em todas as amostras coletadas. O organismo em questão apresentou sensibilidade a todos os sedimentos aos quais foi exposto, demonstrando maior sensibilidade aos sedimentos que os demais organismos testados.

Segundo Abessa (2003), a contaminação por metais na área interna do canal de Santos pode ser considerada crítica, as concentrações de Cd, Cr, Hg e Ni estavam acima dos níveis potencialmente tóxicos. Os níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PHA's) de acordo com os dados obtidos por (Abessa, 2002; Lamparelli *et al.*, 2001; Bonetti, 2000; Prósperi *et al.* 1988; Medeiros, 2000) foram muito elevados, PCB's, dioxinas e furanos também foram encontradas (Lamparelli *et al.*, 2001; Bonetti, 2000). Para o canal de São Vicente não foi possível comparação por não haver uma base

de dados da qualidade dos sedimentos. Os elevados níveis de mercúrio foram relacionados com a atividade industrial, operação dos terminais e o aporte vindo dos rios (Lamparelli *et al.*, 2001). Os sedimentos de São Vicente apresentam altos níveis de hidrocarbonetos alifáticos (Abessa, 2002; Bonetti, 2000; Medeiros, 2000), hidrocarbonetos halogenados como clorofórmio, tricloroetileno e hexaclorobenzeno (Lamparelli *et al.*, 2001), detergentes (Abessa, 2002; Medeiros, 2000).

Abessa *et al.*, (2001) numa avaliação preliminar da toxicidade dos sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente observou que os sedimentos apresentaram toxicidade ao anfípodo *T. viscana*. No mesmo estudo observou-se também, que dos contaminantes avaliados DDT, Dieldrin, Hg, Pb, Zn e Cu todos excederam os limites estabelecidos pelos critérios internacionais de referência. De acordo com Cesar *et al* (2007) que comparou a toxicidade dos estuários de Santos e São Vicente com estuários de Cádiz na Espanha, os sedimentos coletados em 2 pontos da baixada santista apresentaram alta toxicidade aos anfípodos.

Torres *et al.*, (2009), observaram que os sedimentos do porto de Santos apresentam concentrações elevadas de alguns contaminantes, excedendo os níveis 1 e 2 do CONAMA 344/04. O mesmo estudo classifica os sedimentos do Ponto Alemoa como de classe D, baseado no organograma proposto por Mozeto *et al.*,(2006), este utiliza-se de dados químicos e ecotoxicológicos na classificação dos sedimentos.

Ao longo do tempo a qualidade dos sedimentos do complexo portuário de Santos foi melhorando, devido à fiscalização da CETESB, no entanto, os sedimentos devem apresentar algum contaminante dos mencionados anteriormente com concentração elevada. Pois, afetaram significativamente a sobrevivência de *T. biminiensis* e a fecundidade e taxa de eclosão de *Nitokra* sp (Tabela 1).

**Tabela 1:** Comparação da toxicidade entre *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp nos parâmetros analisados quando expostos aos sedimentos do complexo Estuarino de Santos e São Vicente - SP.

| Sistema Estuarino de Santos e São Vicente |        |                 |        |         |
|---|--------|-----------------|--------|---------|
| <i>Sobrevivência</i>                      |        |                 |        |         |
| Organismos                                | Alemoa | Cosipa/Usiminas | Marina | Mariana |
| <i>Tiburonella viscana</i>                | NT     | NT              | NT     | NT      |
| <i>Tisbe biminiensis</i>                  | NT     | TA              | TA     | NT      |
| <i>Nitokra sp</i>                         | NT     | NT              | NT     | NT      |
| <i>Fecundidade</i>                        |        |                 |        |         |
| <i>Tisbe biminiensis</i>                  | NT     | NT              | NT     | NT      |
| <i>Nitokra sp</i>                         | TC     | TC              | TC     | TC      |
| <i>Taxa de Eclosão</i>                    |        |                 |        |         |
| <i>Tisbe biminiensis</i>                  | NT     | NT              | NT     | NT      |
| <i>Nitokra SP</i>                         | TC     | TC              | TC     | TC      |

NT- não tóxico; TA- toxicidade aguda; TC – toxicidade crônica

Na exposição dos copépodos aos sedimentos contaminados coletados no Complexo Estuarino de Suape, observamos que há um padrão nos resultados observados. Não foi observada diferença significativa em relação ao controle, quanto à sobrevivência, os organismos não apresentaram sensibilidade letal aos sedimentos. No entanto, para a fecundidade, houve toxicidade em 2 amostras para o copépodo *T. biminiensis*, já para *Nitokra sp*, houve toxicidade em 5 amostras. Quando observamos a taxa de eclosão, que é a relação entre a fecundidade total e o número de fêmeas ao final do teste observa-se que para o *Tisbe* houve toxicidade em apenas uma amostra, para *Nitokra* todas as amostras testadas foram diferentes do controle (Tabela 2). A taxa de eclosão é um dado preocupante, pois os contaminantes presentes nos sedimentos interferem diretamente na produção de prole.

**Tabela 2:** Comparação da toxicidade entre *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp nos parâmetros analisados quando expostos aos sedimentos do complexo Estuarino de Suape - PE.

| Sistema Estuarino de Suape |                        |    |    |    |    |    |
|----------------------------|------------------------|----|----|----|----|----|
|                            | <i>Sobrevivência</i>   |    |    |    |    |    |
| Organismos                 | P1                     | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| <i>Tisbe biminiensis</i>   | NT                     | NT | NT | NT | NT | NT |
| <i>Nitokra</i> sp          | NT                     | NT | NT | NT | NT | NT |
|                            | <i>Fecundidade</i>     |    |    |    |    |    |
| <i>Tisbe biminiensis</i>   | TC                     | NT | NT | TC | TC | TC |
| <i>Nitokra</i> sp          | TC                     | TC | TC | NT | TC | TC |
|                            | <i>Taxa de Eclosão</i> |    |    |    |    |    |
| <i>Tisbe biminiensis</i>   | NT                     | NT | NT | NT | TC | NT |
| <i>Nitokra</i> sp          | TC                     | TC | TC | TC | TC | TC |

NT – não tóxico; TC – toxicidade crônica; TA – toxicidade aguda.

Estudos recentes realizados na área do Complexo Portuário de Suape mostraram que os compartimentos água e sedimento encontram-se comprometidos (Araújo, 2008; Araujo-Castro, 2008; Chagas, 2003). Desde o ano de 2003 testes de toxicidade vem sendo realizados com os sedimentos do Sistema Estuarino de Suape, ao longo dos anos a subletalidade nos testes de toxicidade sempre foi observada. Araújo-Castro em (2008) comparou os níveis de metais e HPA's encontrados no Porto de Suape em relação a outras localidades no Brasil e no mundo. As concentrações de metais encontradas para em Suape foram inferiores as observadas em outras localidades, de modo geral os efeitos tóxicos são ocasionalmente ou raramente esperados tanto para metais quanto pra HPA's. Para os sedimentos estuarinos de Suape, *Nitokra* sp demonstrou ser mais sensível que *T. biminiensis*. Apenas o ponto P4 não foi diferente do controle significativamente quanto à fecundidade, no entanto, na relação fecundidade/fêmea houve diferença.

Por fim, a exposição dos copépodos ao sedimento coletados nas proximidades da Ilha de Deus mostrou que ambos foram sensíveis a amostra testada. Sendo assim, para este sedimento em questão não houve diferenças nos resultados observados entre os copépodos (Tabela 3). Oliveira (2008) avaliou a toxicidade dos sedimentos do Parque dos Manguezais, e observou que as amostras de sedimentos coletadas no rio Jordão, apresentaram toxicidade letal e subletal ao copépodo *Tisbe biminiensis*. Segundo trabalho publicado por Silva *et al.*, (2010), os níveis dos metais traços Zn, Mn e Cr na área é mais elevado que os valores de referência estabelecidos.

**Tabela 3:** Comparação da toxicidade entre *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp nos parâmetros analisados quando expostos aos sedimentos da Ilha de Deus , Parque dos Manguezais - PE.

| Pina                     |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Organismos               | <i>Sobrevivência</i> |
| <i>Tisbe biminiensis</i> | NT                   |
| <i>Nitokra SP</i>        | NT                   |
| <i>Fecundidade</i>       |                      |
| <i>Tisbe biminiensis</i> | TC                   |
| <i>Nitokra SP</i>        | TC                   |
| <i>Taxa de Eclosão</i>   |                      |
| <i>Tisbe biminiensis</i> | TC                   |
| <i>Nitokra SP</i>        | TC                   |

NT – não tóxico; TA – toxicidade aguda; TC – toxicidade crônica

Araújo-Castro (2008) realizou um estudo comparativo entre a sensibilidade do copépodo *T. biminiensis* e da pós-larva do camarão *Litopenaeus vannamei* aos sedimentos da Baía de Todos os Santos, e observou que o camarão não apresentou

sensibilidade aos sedimentos testados, enquanto o copépodo apresentou toxicidade subletal.

Os testes de referência são imprescindíveis na realização dos testes e toxicidade, Araujo- Castro *et al.*, (2009) observaram que a CL50-96h de *T. biminiensis* para o  $K_2Cr_2O_7$  foi 9,45 mg.L<sup>-1</sup> e DSS (Dodecil Sulfato de Sódio) 8,70 mg.L<sup>-1</sup> (Araújo *et al*, 2006) . Já para *Nitokra* sp, a CL50 do  $K_2Cr_2O_7$  segundo Bergmann Filho, 2006 foi em torno de 21 mg.L<sup>-1</sup>, para DSS 7,24 mg.L<sup>-1</sup> e Sulfato de Zinco 3,26 mg.L<sup>-1</sup> (Machado, 2010).

Em ecotoxicologia o ideal para a avaliação de um local impactado é fazer pelo menos três diferentes testes, estes utilizando indivíduos de diferentes níveis tróficos. No entanto, não é necessário utilizar uma espécie de um mesmo grupo de organismos, espécies do mesmo grupo geralmente apresentam sensibilidade semelhante, e, organismos de níveis tróficos distintos podem apresentar sensibilidades diferentes (Aragão & Araújo, 2006).

Os testes realizados mostram a importância na utilização de organismos como os copépodos, pois são de fácil obtenção em cultivos, os bioensaios são rápidos e nos dão resultados coerentes e semelhantes a outros testes de toxicidade.

## 2.5 CONCLUSÃO

Os testes realizados com os sedimentos do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, Sistema Estuarino de Suape e Pina demonstraram que ambos os copépodos foram sensíveis a contaminação histórica de seus sedimentos. Os copépodo *Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp foram sensíveis ao endpoint subletal. Os resultados obtidos corroboram a hipótese proposta de que os dois copépodos testados são sensíveis e

mostram um padrão semelhante na resposta ecotoxicológica. No entanto, *Nitokra* apresenta uma maior sensibilidade. O copépodo *Nitokra* sp é uma espécie estuarina, já *Tisbe biminiensis* é uma espécie marinha, portanto, são organismos complementares, cada uma das espécies deve ser utilizada de acordo com a origem da amostra ambiental a ser testada.

Logo, ambos os organismos podem ser utilizados, recomenda-se a utilização dos dois testes em paralelo quando possível, a fim de obter uma resposta ecotoxicológica da amostra ambiental mais conclusiva, bem como realizar testes com organismos de outros níveis tróficos.

## 2.6 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abessa, D.M.S., Sousa, E.C.P.M., Rachid, B.R.F., & Mastroti, R., 1998. **Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a tool in marine sediments contamination assessment.** *Brazilian Archives of Biology and Technology* 41 (2), 225–230.
- Abessa, D.M.S., Sousa, E.C.P.M., Rachid, B.R.F. & Mastroti, R.R., 2001. **Sediment toxicity in Santos estuary, SP- Brazil: preliminary results.** *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 4 (1): 6-9. Abessa, D.M.S., 2002. **Avaliação da Qualidade de Sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil.** Tese de Doutorado, USP, 290p.
- Abessa, D.M.S. 2003. Qualidade de Sedimentos Marinhos e Estuarinos da Baixada Santista: Importância para o Gerenciamento Costeiro. Anais do III Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde. CD-rom, pp. 5-9.
- Abessa, D. M. S.; Sousa, E. C. P. M.; Tommasi, L. R., 2006. **Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos.** *Revista de Geologia*, 19 (2): 253-261.

- ABNT NBR 15350, 2006, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).
- Adams, W.J., Kimerle, R.A. & Barnett, J.W., 1992, **(SEM TITULO)**. *Environmental Science and Technology*, 26 (10): 1865-1875.
- Andersen, H.R.; Wollenberger, L.; Halling-Sørensen, B.; Kusk, K.O., 2001. **Development of copepod nauplii to copepodites - a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption**. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2821–2829.
- Aragão, M. A.; Araújo, R. P. A., 2006. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Ecotoxicologia Aquática Princípios de Aplicações. Ed. Rima. p 117-152.
- Araújo, R. J. V.; Araújo-Castro, C. M. V.; Souza-Santos, L. P., 2006. **Teste de sensibilidade de *Tisbe biminiensis* ao Dodecil Sulfato de Sódio**. In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro, SP.
- Araújo-Castro, C. M. V., 2008. **Padronização e aplicação do copépodo marinho *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia. 104p.
- Araújo-Castro, C. M. V.; Souza-Santos, L. P.; Torreiro, A. G. A. G.; Garcia, K. S., 2009. **Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size**. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57 33-41.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 1993. ASTM (E1391-90). Standard guide for conducting 10 – days static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. In: annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, ASTM.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 2004. ASTM (E2317-04). **Standard Guide for Conducting Renewal Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod**.

- Baird, D.J.; Maltby, L.; Greig-Smith, P.W.; Douben, P.E.T., 1996. **ECOTOXICOLOGY: Ecological Dimensions**. (Eds.) Chapman and Hall, London.
- Barata, C.; Medina, M.; Telfer, T.; Baird, D. J., 2002. **Determining demographic effects of cypermethrin in marine copepod *Acartia tonsa*: stage-specific short tests versus life-table tests**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 373-378.
- Bechmann R. K. 1994, **Use of life tables and LC50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod *Tisbe furcata* (Baird)**. *Environmental Toxicology Chemistry* 13:1509–1517.
- Bechmann, R.K., 1999. **Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai***. *Science of the Total Environment* 233, 33–46.
- Bengtsson, B. E. (1978). **Use of Harpacticoid copepod in toxicity test**. *Marine Pollution Bulletin* 9, 238—241.
- Bergmann Filho, T.U., 2006. **Toxicidade da água intersticial do Estuário de Santos e São Vicente e sensibilidade do copépodo *Nitocra* sp ao cloreto de amônia. Tese apresentada para obtenção do título de Especialista em Gestão Ambiental**. Centro Universitário SENAC. São Paulo.
- Bonetti, C., 2000. **Foraminíferos como bioindicadores do gradiente de estresse ecológico em ambientes costeiros poluídos. Estudo aplicado ao sistema estuarino de Santos - São Vicente (SP, Brasil)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 229p. + anexos.
- Böttger, S. A.; McClintock, J. B., 2001. **The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata:Echinoidea)**. Part C129, 307-315.
- Brasil, 2004, Resolução nº 344, de 25 de março de 2004. **Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências**. Diário Oficial, Brasília, Edição nº 87 de 07/05/2004.

- Breitholtz, M.; Bengtsson, B.-E., 2001. **Oestrogens have no hormonal effect on the development and reproduction of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*.** *Marine Pollution Bulletin* 42, 879–886.
- Breitholtz, M.; Wollenberger, L.; Dinan, L., 2003. **Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*.** *Aquatic Toxicology* 63:103–118.
- Cesar, A., 2003, **Análises ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España.** Tese de doutorado, Universidade de Murcia, Espanha.
- Cesar, A.; Marpin, A.; Marin-Guirao, L.; Vita, R., 2004, **Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay.** *Sci. Mar.*, 68(suppl. 1): 205-213
- Cesar, A.; Choueri, R. B.; Riba, I.; Morales-Caselles, C.; Pereira, C. D. S.; Santos, A. R.; Abessa, D. M. S.; DelValls, T. A., 2007. Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system). *Environment International* 33, 429-435.
- CETESB, 1999, **Água do mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck, 1816 (Echinodermata : Echinoidea).** L5.250, Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil, 22p.
- Chagas, A. C. O., 2003. **Níveis de metais pesados e hidrocarbonetos em sedimentos do Complexo Portuário de Suape – PE – Brasil.** Dissertação de Mestrado em Oceanografia. 80p.
- Chandler, G.T., Scott, G.I., 1991. **Effects of sediment bound endosulfan on survival, reproduction and larval settlement of meiobenthic polychaetes and copepods.** *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 375–382.
- Chandler G. T., Green, A. S. 2001, **Developmental stage-specific life- cycle bioassay for assessment of sediment-associated toxicant effects on benthic copepod production.** *Environmental Toxicology Chemistry* 20:171–178

- Chandler, G.T., Cary, T., Volz, D., Walse, S., Ferry, J., Klosterhaus, S., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 117–124.
- Chapman, P.M. & Long, E.R., 1983. **The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment.** *Marine Pollution Bulletin*, 14 (3):81-84.
- Chapman, P.M., 1995. **Ecotoxicology and pollution-key issues.** *Marine Pollution Bulletin* 31, 167–177.
- Chapman, P. M., 2002. **Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology.** *Marine Pollution Bulletin*, 44, 7-15.
- Coull, B. C., 1990. **Are members of the meiofauna food for higher trophic levels?** *Trans Am Microsc Soc* 109:233–246.
- Coull BC, Chandler GT. 1992. **Pollution and meiofauna: Field, laboratory and mesocosm studies.** *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 30:191–271.
- Dahl, U., Gorokhova, E., Breitholtz, M., 2006. **Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using a harpacticoid copepod.** *Aquatic Toxicology* 77, 433–438.
- DeWitt, T.H., Swartz, R.C. & Lamberson, J.O., 1989, **Measuring the acute toxicity of estuarine sediments.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 1035-1048.
- Diz, F. R., Araújo, C. V. M., Moreno-Garrido, I., Hampel, M., Blasco, J., 2009. **Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*: Lethal and reproductive endpoints.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1881-1886.
- EDMAR, 2002. **Endocrine Disruption in the Marine Environment Programme. Department for Environment Food and Rural Affairs.** [http://www.defra.gov.uk/ENVIRONMENT/chemicals/hormone/pdf/edmar\\_final.pdf](http://www.defra.gov.uk/ENVIRONMENT/chemicals/hormone/pdf/edmar_final.pdf)
- ENVIRONMENT CANADA, 1992. **Biological test method: fertilization assay using echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars).** Report EPS 1/ RM/27.

- Forget J, Pavillon J, Menasria M, Bocquene G., 1998. **Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malahion.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:239–244
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F., 2005. **Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe).** *Ecotoxicology Environmental Safety*. 60, 288–294.
- Gama, A. M. S.; Zamboni, A. J. Z. , 1999. **Aspectos da biologia e do cultivo de *Metamysidopsis elongata* atlântica para uso em testes de toxicidade.** Nauplius, Rio Grande, v.7, p. 127-139.
- Goldberg, E. D., 1995. **Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century.** *Marine Pollution Bulletin*, 31.
- Huang, Y.; Zhu, L.; Liu, G., 2006. **The Effects of bis(tributyltin) oxide on the development, reproduction and sex ratio of calanoid copepod *Pseudodiaptomus marinus*.** *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69, 1:2, 147-152.
- Hutchinson, T.H., Pounds, N.A., Hampel, M., Williams, T.D.,1999. **Impact of natural and synthetic steroids on the survival development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*).** *Sci. Total Environ.* 233, 167–179.
- Hutchinson, T.H., Pounds, N.A., Hampel, M., Williams, T.D., 1999. **Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol.** *Environmental Toxicology Chemistry* 18, 2914–2920.
- Ihara, P. M.; Pinho, G. L. L.; Fillmann, G., 2010. **Avaliação do copéodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica.** *Journal of the Brazilian Society of Toxicology*, 5:1, 27-32.
- ISO 14669 – **Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (*Copepoda, Crustacea*).**

- Kennish, M. J., Ed., **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.
- Klemm, D. J.; Morrison, G. E.; Norberg-King, T. J. et al. 1994. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. 2ed. Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-91/003, 482p.
- Kobayashi, N., 1974, **Bioassay data for marine pollution using sea urchin eggs, 1972 and 1973**. Publications of Setorial Marine Biology Laboratory, 21 (5/6): 411-432.
- Kusk, K.O., Wollenberger, L., 2007. **Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods**. *Ecotoxicology* 16, 183–195
- Kwok, K. W. H; Leung, K. M. Y.; Bao, V. W. W. ; Lee, Jae-Seong, 2008. **Copper toxicity in the marine copepod *Tigriopus japonicus*: low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests**. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 632-636.
- Lamparelli, M.L.; Costa, M.P.; Prósperi, V.A.; Beviláquia, J.E.; Araújo, R.P.A.; Eysink, G.G.L.; Pompéia, S., 2001. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. Relatório Técnico CETESB, São Paulo, SP, 178 p. Lamberson, J.O., DeWitt, T.H. & Swartz, R.C., 1992. **Assessment of sediment toxicity to marine benthos**. In: Burton, GA (Ed.). *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, 183-211.
- Lee, K.; Raisuddin, D.; Hwang, D.; Park, H. G.; Dahms, H.; Ahn, I., 2008. **Chemosphere two-generation toxicity study on the copepod model species *Tigriopus japonicus***. *Chemosphere* 72, 1359-1365.
- Lotufo, G. R.; Abessa, D.M. S. **Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos**. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais, 2002. p. 151-162.
- Lotufo, L.V., 2008, Echinodermata como modelo para ecotoxicologia. *XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia*, Curitiba, PR.

- Machado, L. I. S., 2010. **Ensaio ecotoxicológico utilizando o copépode bentônico *Nitokra* sp. Espécie promissora para normatização no país.** Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Rio Grande. 36p.
- Maurat, M. C. S., 1996. **Efeito crônico do óleo bruto, de dispersante de petróleo e da mistura óleo/dispersante na espécie *Champia parvula* – macroalga.** Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 76p.
- Mastroti, R. R., 1997. **Toxicidade e biodegradabilidade de surfactantes aniônicos em água do mar.** Dissertação de mestrado. Instituto Oceanográfico, universidade de São Paulo, 112p.
- Medeiros, P. M., 2000. Avaliação da origem de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos de Santos e São Sebastião, utilizando-se hidrocarbonetos marcadores geoquímicos. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 102p.
- Melo, S. L. R., 1993. **Testes de Toxicidade com sedimentos marinhos, adequação de metodologia para o anfípodo escavador *Tiburonella viscana*.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 172p.
- Melo, S.L.R., & Abessa, D.M.S., 2002. **Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando anfípodos.** In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M. (Eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha — Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda., pp. 163–178 (in Portuguese).
- Melo, S. R. L. & Nipper, M., 2007. **Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyischnopidae).** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 412-420.
- Moraes, R.B.C., Pfeiffer, W.C., Guimarães, J.R.D., Borges, A., Campos, A., 1996. **Avaliação da toxicidade de sedimentos das Baías de Guanabara e Sepetiba - RJ.** In: *III Simpósio sobre Oceanografia IOUSP*, São Paulo. Abstracts, p. 328 (in Portuguese).

- Mozeto A. A., Umbuzeiro G. A., Araújo R. P. A., Jardim W. F., 2006 **Esquema de avaliação integrada e hierárquica da qualidade de sedimentos (AIHQs)**. In: Mozeto A. A., Umbuzeiro G. A., Jardim WF (eds) Manual de protocolos de métodos físicos, químicos, biológicos e ecotoxicológicos de avaliação da qualidade de sedimento. Projeto QualiSed. Capítulo 13
- Nascimento, I.A. & Evangelista, A.J.A., 2002. **Testes de toxicidade com sedimento usando-se pós-larvas de camarões *Litopenaeus sp* (Crustacea; Decapoda)**. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M. (Eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha—Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda., pp. 189–194.
- Nascimento, I. A., 2002. **Testes de toxicidade com embriões da ostra *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828)**. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M. (Eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha—Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda., pp. 73-81.
- Nipper, M. G.; Prósperi, V. A.; Zamboni, A. J. 1993. **Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Equinoderm sperm and embryos**. In: SETAC Annual Meeting, 19. San Francisco, 1v.
- OECD, 2006. **Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle toxicity tests with an emphasis on developmental, reproductive and endocrine disruptive effects**. *OECD Series on Testing and Assessment*, Number 55, ENV/JM/ MONO(2006)22, Environment Directorate, Organisation for Economic Co- operation and Development, Paris, p. 125.
- Oliveira, D. D., 2008. **Toxicidade dos sedimentos do Parque dos Manguezais, Recife – Pernambuco – Brasil**. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Federal de Pernambuco. 25p
- Prósperi, V. A.; Eysink, G. G. J.; Saito, L. M., 1988. **Avaliação do grau de contaminação do sedimento ao longo do canal de navegação do porto de Santos**. Relatório Técnico CETESB, 33p + anexos.
- Prósperi, V. A., 1993. **Aplicação de teste de toxicidade com organismos marinhos para análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas**.

Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 120p.

Prósperi, V. A.; Nipper, M. G.; Buratini, S. V., 1994. **Desenvolvimento de metodologia de cultivo e testes de toxicidade com organismos marinhos.** Relatório técnico. São Paulo, CETESB, 20p.

Prósperi, V. A., 1998. **Desenvolvimento de metodologia de cultivo e testes de toxicidade com organismos marinhos.** Relatório técnico. São Paulo, CETESB, 46p.

Rachid, B. R. F., 1996. **Ecotoxicidade de efluentes sanitários urbanos lançados ao mar através de emissários submarinos.** Dissertação de mestrado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 110p.

Silva, E. M.; Chastinet, C. B. A.; Navarro, M. F. T.; Barros, A. F.; Cavalcante, P.; Mota, M. F. V., 2000. **Utilização de ensaios de ecotoxicidade com *Tisbe holothuriae* (Copepoda: Harpacticoida) em programas de avaliação da toxicidade de efluentes complexos.** In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A.L. Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI. São Carlos: RIMA, 2000. p. 451-460.

Silva, H. K. P.; Macedo, S. J.; Brayner, F. M. M., 2010. **Avaliação das concentrações de metais traço nos sedimentos do Parque dos Manguezais, Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco, Brasil.** *Tropical Oceanography*, 38:2, 188-194.

Templeton, R.C., Ferguson, P.L., Washburn, K.M., Scrivens, W.A., Chandler, G.T., 2006. **Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod.** *Environmental Science Technology* 40, 7387–7393.

Torres, R. J., Abessa, D. M. S., Santos, F. C., Maranhão, L. A., Davanzo, M. B., Nascimento, M. R. L., Mozeto, A. A., 2009. **Effects of dredging operations on sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, Sp, Brazil.** *Journal Soils Sediments*.

- USEPA, 1995, **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms**. First edition (EPA/600/R-95-136).
- Volkman-Rocco, B., 1973. **Tisbe biniensis (Copépoda, Harpacticoida) new species of the gracilis group**. Archives Oceanography Limnology , 8, 71-90.
- Zamboni, A. J, 1993. **Avaliação da qualidade de água e sedimentos do Canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com Lytechinus variegatus (Equinoderma: Echinoidea)**. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 102p + fig.
- Zamboni, A.J., 2000. **Seleção de espécies-teste locais e aplicação do conceito de “Triade de Qualidade de Sedimentos” na caracterização Ecotoxicológica do Estuário da Lagoa dos Patos no Entorno da cidade de Rio Grande, RS**. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil
- Zamboni, A.J. ;Costa, J.B., 2002. **Testes de toxicidade com sedimentos estuarinos utilizando tanaidáceos**. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M. (Eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha— Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda., pp. 179–187.
- Zagatto, P. A.; Bertoletti, E., 2006. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, Rima, 478p.
- Webber, C. I.; Horning II, W. B.; Klemm, D. J. et al. 1988. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms**. Cincinnati, Ohio, EPA-600/4-87/028, 417p.
- Webber, C.I., 1991. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 4ed. Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027, 293p.
- Whitemarsh, D., 1999. **Putting a price on the marine environment**. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 65.

- Williams, T.D., 1992. **Survival and development of copepod larvae *Tisbe battagliai* in surface microlayer water and sediment elutriates from the German Bight.** *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 221–228.
- Williams, T.D., Hutchinson, T.H., Roberts, G.C., Coleman, C.A., 1993. **The assessment of industrial effluent toxicity using aquatic microorganisms, invertebrates and fish.** *Sci. Total Environ.* 134 (2), 1129–1141.
- Williams, T.D., Jones, M.B., 1994. **Effects of temperature and food quantity on postembryonic development of *Tisbe battagliai* (Copepoda: Harpacticoida).** *Journal Experimental Marine Biology and Ecology.* 183, 283–298.
- Wulff, F., 1972. **Experimental studies on physiological and behavioural response mechanism of *Nitocra spinipes* (Crustacea: Harpacticoidea) from brackish-water rockpools.** *Marine Biology* 13, 325–329.